

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/EP05/000695

International filing date: 21 January 2005 (21.01.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: ES
Number: P200400120
Filing date: 21 January 2004 (21.01.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 24 March 2005 (24.03.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse



MINISTERIO
DE INDUSTRIA, TURISMO
Y COMERCIO

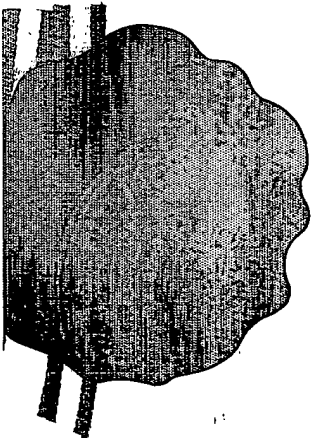


Oficina Española
de Patentes y Marcas

CERTIFICADO OFICIAL

Por la presente certifico que los documentos adjuntos son copia exacta de la solicitud de PATENTE DE INVENCION número 200400120 , que tiene fecha de presentación en este Organismo el 21 de Enero de 2004.

Madrid, 10 de Febrero de 2005



El Director del Departamento de Patentes
e Información Tecnológica

P.D.

ANA Mª REDONDO MÍNGUEZ

(1) MODALIDAD:

☒ PATENTE DE INVENCION ☐ MODELO DE UTILIDAD

(2) TIPO DE SOLICITUD:

- ☐ ADICION A LA PATENTE
☐ SOLICITUD DIVISIONAL
☐ CAMBIO DE MODALIDAD
☐ TRANSFORMACION SOLICITUD PATENTE EUROPEA
☐ PCT: ENTRADA FASE NACIONAL

(3) EXP. PRINCIPAL O DE ORIGEN:
MODALIDAD
N° SOLICITUD
FECHA SOLICITUD

4 ENE 21 11:25

FECHA Y HORA DE PRESENTACION EN LA O.E.P.M.

FECHA Y HORA PRESENTACION EN LUGAR DISTINTO O.E.P.M.

(4) LUGAR DE PRESENTACION: CODIGO
MADRID 28

(5) SOLICITANTE (S): APELLIDOS O DENOMINACION SOCIAL
CONSEJO SUP. INVESTIG. CIENTIFICAS
BIONOSTRA, S.L.

NOMBRE

NACIONALIDAD

CODIGO PAIS

DNI/CIF

CNAE

PYME

ESPAÑOLA
ESPAÑOLA

ES
ES

Q2818002D

(6) DATOS DEL PRIMER SOLICITANTE:

DOMICILIO SERRANO, 117
LOCALIDAD MADRID
PROVINCIA MADRID
PAIS RESIDENCIA ESPAÑA
NACIONALIDAD ESPAÑOLA

OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS
Dpto. SECRETARIA GENERAL
REPROGRAFIA
Panamá, 1 - Madrid 28071

TELÉFONO 91 5855000

FAX 91 5855287

CORREO ELECTRÓNICO ott@csic.es

CÓDIGO POSTAL 28006

CÓDIGO PAIS ES

CÓDIGO PAIS ES

(7) INVENTOR (ES):

APELLIDOS

NOMBRE

NACIONALIDAD

CODIGO

RODRIGUEZ AGUIRRE
RUIZ CASTON
GONZALEZ DE LLANO

JOSE FCO
JOSE
Mª DOLORES

ESPAÑOLA
ESPAÑOLA
ESPAÑOLA

PAIS
ES
ES
ES

(8)

☐ EL SOLICITANTE ES EL INVENTOR

☒ EL SOLICITANTE NO ES EL INVENTOR O ÚNICO INVENTOR

(9) MODO DE OBTENCION DEL DERECHO:

☒ INVENC. LABORAL

☐ CONTRATO

☐ SUCESION

(10) TITULO DE LA INVENCION:

CÁPSIDAS VACÍAS QUIMÉRICAS DEL VIRUS CAUSANTE DE LA ENFERMEDAD DE LA BURSITIS INFECCIOSA (IBDV), SU PROCEDIMIENTO DE OBTENCIÓN Y APLICACIONES

(11) EFECTUADO DEPÓSITO DE MATERIA BIOLÓGICA:

☐ SI

☒ NO

(12) EXPOSICIONES OFICIALES: LUGAR

FECHA

(13) DECLARACIONES DE PRIORIDAD:

PAIS DE ORIGEN

CODIGO
PAIS

NÚMERO

FECHA

(14) EL SOLICITANTE SE ACOGE AL APLAZAMIENTO DE PAGO DE TASAS PREVISTO EN EL ART. 162. LEY 11/86 DE PATENTES ☐

(15) AGENTE /REPRESENTANTE: NOMBRE Y DIRECCION POSTAL COMPLETA. (SI AGENTE P.I., NOMBRE Y CODIGO) (RELLENSE, ÚNICAMENTE POR PROFESIONALES)

(16) RELACION DE DOCUMENTOS QUE SE ACOMPAÑAN:

- ☒ DESCRIPCION N° DE PAGINAS: ☐ DOCUMENTO DE REPRESENTACION
☒ N° DE REIVINDICACIONES: ☒ JUSTIFICANTE DEL PAGO DE TASA DE SOLICITUD
☒ DIBUJOS. N° DE PAGINAS: ☒ HOJA DE INFORMACION COMPLEMENTARIA
☒ LISTA DE SECUENCIAS N° DE PAGINAS: ☐ PRUEBAS DE LOS DIBUJOS
☒ RESUMEN ☐ CUESTIONARIO DE PROSPECCION
☐ DOCUMENTO DE PRIORIDAD ☒ OTROS: AUTORIZACION
☐ TRADUCCION DEL DOCUMENTO DE PRIORIDAD

FIRMA DEL SOLICITANTE O REPRESENTANTE

Domingo Lopez
(VER COMUNICACION)

FIRMA DEL FUNCIONARIO

NOTIFICACION SOBRE LA TASA DE CONCESION:

Se le notifica que esta solicitud se considerará retirada si no procede al pago de la tasa de concesión; para el pago de esta tasa dispone de tres meses a contar desde la publicación del anuncio de la concesión en el BOPI, más los diez días que establece el art. 81 del R.D. 2245/1986.

II MO. SR. DIRECTOR DE LA OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

NO CUMPLIMENTAR LOS RECUADROS ENMARCADOS EN ROJO

P200400120

FECHA DE PRESENTACIÓN

RESUMEN Y GRÁFICO

RESUMEN (Máx. 150 palabras)

CÁPSIDAS VACÍAS QUIMÉRICAS DEL VIRUS CAUSANTE DE LA ENFERMEDAD DE LA BURSITIS INFECCIOSA (IBDV), SU PROCEDIMIENTO DE OBTENCIÓN Y APLICACIONES

Las cápsidas vacías quiméricas del virus causante de la enfermedad de la bursitis infecciosa (IBDV) están constituidas por ensamblaje de (i) proteínas pVP2 de IBDV y (ii) proteínas de fusión que comprenden una región A constituida por la proteína VP3 de IBDV unida a una región B constituida por un polipéptido heterólogo que comprende un polipéptido de interés, tal como un polipéptido útil en vacunación, terapia o diagnóstico.

GRÁFICO



MINISTERIO
DE CIENCIA
Y TECNOLOGÍA



Oficina Española
de Patentes y Marcas

NÚMERO DE SOLICITUD

P200400120

FECHA DE PRESENTACIÓN

☐ PATENTE DE INVENCION

☐ MODELO DE UTILIDAD

(5) SOLICITANTES:

APELLIDOS O
DENOMINACIÓN SOCIAL

NOMBRE

NACIONALIDAD

CÓDIGO
PAÍS

DNI/CIF

CNAE

PYME

(7) INVENTORES:

APELLIDOS

NOMBRE

NACIONALIDAD

RODRÍGUEZ AGUIRRE

BLANCO CHAPINAL

OÑA BLANCO

SAUGAR GÓMEZ

ABAITUA ELUSTONDO

LUQUE BUZO

RODRÍGUEZ FERNÁNDEZ-ALBA

M^a DOLORES

SOLEDAD

ANA M^a

IRENE

FERNANDO

DANIEL

JUAN RAMÓN

ESPAÑOLA

ESPAÑOLA

ESPAÑOLA

ESPAÑOLA

ESPAÑOLA

ESPAÑOLA

ESPAÑOLA

(12) EXPOSICIONES OFICIALES:

LUGAR

FECHA

(13) DECLARACIONES DE PRIORIDAD:

PAÍS DE ORIGEN

CÓDIGO
PAÍS

NÚMERO

FECHA



P200400120

12

SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION

21 NÚMERO DE SOLICITUD

31 NÚMERO

DATOS DE PRIORIDAD

32 FECHA

33 PAÍS

22 FECHA DE PRESENTACIÓN

62 PATENTE DE LA QUE ES
DIVISORIA

71 SOLICITANTE (S)

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS Y
BIONOSTRA. S.L.

DOMICILIO SERRANO, 117 - 28006 MADRID

NACIONALIDAD ESPAÑOLA

72 INVENTOR (ES) José Francisco Rodríguez Aguirre, José Ruiz Castón, M^a Dolores González de Llano, M^a Dolores Rodríguez Aguirre, Soledad Blanco Chapinal, Ana M^a Oña Blanco, Irene Saugar Gómez, Fernando Abaitua Elustondo, Daniel Luque Buzo y Juan Ramón Rodríguez Fernández-Alba

51 Int. Cl.

GRÁFICO (SÓLO PARA INTERPRETAR RESUMEN)

54 TÍTULO DE LA INVENCION

CÁPSIDAS VACÍAS QUIMÉRICAS DEL VIRUS CAUSANTE DE LA
ENFERMEDAD DE LA BURSITIS INFECCIOSA (IBDV), SU
PROCEDIMIENTO DE OBTENCIÓN Y APLICACIONES

57 RESUMEN

CÁPSIDAS VACÍAS QUIMÉRICAS DEL VIRUS CAUSANTE DE LA ENFERMEDAD DE LA BURSITIS INFECCIOSA (IBDV), SU PROCEDIMIENTO DE OBTENCIÓN Y APLICACIONES

Las cápsidas vacías quiméricas del virus causante de la enfermedad de la bursitis infecciosa (IBDV) están constituidas por ensamblaje de (i) proteínas pVP2 de IBDV y (ii) proteínas de fusión que comprenden una región A constituida por la proteína VP3 de IBDV unida a una región B constituida por un polipéptido heterólogo que comprende un polipéptido de interés, tal como un polipéptido útil en vacunación, terapia o diagnóstico.

CÁPSIDAS VACÍAS QUIMÉRICAS DEL VIRUS CAUSANTE DE LA ENFERMEDAD DE LA BURSITIS INFECCIOSA (IBDV), SU PROCEDIMIENTO DE OBTENCIÓN Y APLICACIONES

5. CAMPO DE LA INVENCION

La invención se relaciona con la producción de partículas vacías quiméricas del virus causante de la enfermedad de la bursitis infecciosa (IBDV) y sus aplicaciones.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

- 10 Las partículas virales son estructuras especializadas en el empaquetamiento y la vehiculización de ácidos nucleicos y proteínas. Una característica general de las partículas virales es su excelente capacidad para la estimulación de la respuesta inmune del hospedador. Estas propiedades convierten a las partículas virales en agentes de extraordinario interés para el desarrollo tanto de sistemas de transporte intracelular
- 15 (delivery systems) como para la generación de vacunas particuladas. La utilización de diferentes sistemas de expresión genética ha facilitado la producción de pseudopartículas virales o cápsidas virales vacías (VLPs) de diferentes tipos de virus (Patente US 6,458,362 Casal, et al. 2002. Recombinant VP2 parvoviral pseudo-particles encoding CTL or T-helper cell epitopes; US 5,932,426 Baralle, et al. 1999. Molecular presenting system; US
- 20 6,602,705 Barnett, et al. 2003 Expression of HIV polypeptides and production of virus-like particles). La manipulación genética de estos sistemas de expresión permite, a su vez, la producción de VLPs que contienen secuencias aminoácidas heterólogas, procedentes de proteínas distintas de aquéllas que conforman la cápsida viral nativa. Estas VLPs se denominan genéricamente VLPs heterotípicas, recombinantes o quiméricas (QVLPs). Las
- 25 QVLPs han sido empleadas fundamentalmente con dos finalidades: (i) generación de vacunas multivalentes, mediante péptidos heterólogos inmunogénicamente relevantes (Kingsman, A. J., N. R. Burns, G. T. Layton, and S. E. Adams. 1995. Yeast retrotransposon particles as antigen delivery systems. Ann. N. Y. Acad. Sci. 754: 202–213; Lo-Man, R., P. Rueda, C. Sedlik, E. Deriaud, I. Casal, and C. Leclerc. 1998. A
- 30 recombinant virus-like particle system derived from parvovirus as an efficient antigen carrier to elicit a polarized Th1 immune response without adjuvant. Eur. J. Immunol. 28: 1401–1407; Qiu, Z., D. Ou, H. Wu, T. C. Hobma, and S. Gillam. 1994. Expression and characterization of virus-like particles containing rubella virus structural proteins. J. Virol.

68: 4086–4091); y (ii) modificación del tropismo, mediante inserción de secuencias aminoacídicas involucradas en interacciones con receptor-ligando (Schmidt, U., Rudolf, R., and Böhm, G. 2001. Binding of external ligands onto an engineered virus capsid. *Prot. Eng.* 14: 769-774; Shin, Y.C., and Folk, W.R. 2003. Formation of polyoma virus-like particles with different VP1 molecules that bind the urokinase plasminogen activator receptor. *J. Virol.* 77: 11491-11498).

Las QVLPs se obtienen, en general, mediante la expresión de la(s) proteína(s) viral(es) responsable(s) de la formación de la cápsida viral, fusionada a la región que codifica el polipéptido de interés.

10 El virus causante de la enfermedad de la bursitis infecciosa (IBDV), perteneciente a la familia Birnaviridae, infecta diferentes especies aviares y es el responsable directo de una grave enfermedad inmunosupresora causante de importantes pérdidas económicas en la industria avícola mundial.

Las partículas de IBDV son icosaédricas, con una simetría $T=13$, carecen de
 15 envuelta y están formadas por una única capa proteica. Hasta el momento, las aproximaciones encaminadas a la obtención un modelo atómico para las partículas de IBDV han fracasado. Por ello, la información estructural disponible está basada en modelos tridimensionales generados a partir de imágenes obtenidas por criomicroscopía electrónica del virus purificado y de VLPs. En base a esos estudios, se ha comprobado que
 20 la superficie externa de la partícula está formada por un entramado continuo de 260 trímeros de la proteína VP2 (37 kDa) ordenados en cinco conformaciones diferentes. La cara interna de las partículas contiene 200 trímeros de la proteína VP3 (29 kDa), estos últimos, independientes entre sí, se encuentran unidos a la zona basal de los trímeros de VP2. Se ha sugerido que un tercer polipéptido, VP4 (28 kDa), también podría formar parte
 25 de las partículas, estando situado en la base de los pentámeros que forman los vértices de la estructura icosaédrica.

Los polipéptidos VP2, VP3 y VP4 se producen a partir del procesamiento proteolítico de un polipéptido precursor de un tamaño de 109 kDa. Este precursor se procesa auto-catalíticamente liberando los polipéptidos pVP2 (48 kDa), VP3 y VP4. El
 30 dominio VP4, que se localiza en la región central de la poliproteína, pertenece a la familia de las proteasas Lon y es el responsable del corte proteolítico. Los polipéptidos pVP2 y VP3 son los responsables directos del ensamblaje de las cápsidas. El producto pVP2 sufre un último corte en su extremo C-terminal antes de dar lugar a la forma madura de la

proteína, VP2, que es la que se encuentra en las partículas purificadas (Da Costa, B., Chevalier, C., Henry, C., Huet, J. C., Petit, S., Lepault, J., Boot, H. & Delmas, B. (2002). The capsid of infectious bursal disease virus contains several small peptides arising from the maturation process of pVP2. *Journal of Virology* 76, 2393-2402). Este procesamiento de pVP2 es necesario para la correcta formación de las cápsidas y requiere de la presencia de VP3, aunque la proteasa responsable aún no ha sido identificada (Maraver, A., Oña, A., Abaitua, F., González, D., Clemente, R., Diaz-Ruiz, A., Caston, J. R., Pazos, F. & Rodríguez, J. F. (2003). The oligomerization domain of VP3, the scaffolding protein of infectious bursal disease virus, plays a critical role for capsid formation. *Journal of Virology* 77 :6438-49).

En líneas generales, la morfogénesis es un proceso vital para el ciclo vírico que requiere de pasos sucesivos asociados a modificaciones en los polipéptidos precursores. Por ello, los virus han desarrollado estrategias que permiten la secuencial y correcta interacción entre cada uno de sus componentes. Una de estas estrategias, utilizada con frecuencia por virus icosaédricos, es la utilización de polipéptidos provenientes de una única poliproteína como base de sus componentes estructurales. En estos casos, el adecuado procesamiento proteolítico de dicha poliproteína juega un papel crucial en el proceso de ensamblaje.

En trabajos previos se ha demostrado este principio para el ensamblaje de las cápsidas de IBDV (Fernández-Arias, A., Risco, C., Martínez, S., Albar, J. P. & Rodríguez, J. F. (1998). Expression of ORF A1 of infectious bursal disease virus infectious bursal disease virus results in the formation of virus-like particles. *Journal of General Virology* 79, 1047-1054). La expresión en células eucarióticas del gen codificador para la poliproteína de IBDV da lugar a la formación de VLPs totalmente indistinguibles morfológica y bioquímicamente de los viriones de IBDV. Asimismo, se ha comprobado que el ensamblaje de las cápsidas necesita únicamente de la síntesis y del correcto procesamiento de la poliproteína viral, y es independiente de la presencia del genoma vírico o de otras proteínas codificadas por el genoma viral como son VP5 y VP1.

Los resultados obtenidos hasta la fecha a partir de la expresión de los genes de IBDV en distintos sistemas recombinantes ha permitido concluir que: i) el proceso de ensamblaje es independiente de la presencia del material genético del virus, ii) para el ensamblaje sólo son necesarios los polipéptidos codificados por el gen de la poliproteína,

y iii) el ensamblaje requiere de una interacción coordinada entre los polipéptidos VP2 y VP3.

Sin embargo, hay que indicar que no se conoce si la interacción pVP2/VP3 se establece entre dominios de VP2 y VP3 de la poliproteína precursora cuando aún no ha sufrido modificaciones, o si por el contrario, esta interacción ocurre tras el procesamiento del precursor. Además, la información actual no excluye la posibilidad de que VP4 pudiera jugar un papel relevante en la morfogénesis de la cápsida. De hecho, se han descrito VLPs de IBDV formadas por ensamblaje de las proteínas VP2, VP3 y VP4 de IBDV (US 6,528,063; US 5,788,970 y JP 5194597).

El trabajo desarrollado por estos mismos inventores ha permitido establecer sistemas para la obtención de VLPs de IBDV empleando diferentes vectores de expresión eucariótica. Estos vectores han sido utilizados para la expresión de la poliproteína de IBDV en ausencia o presencia de la RNA polimerasa viral VP1. La caracterización bioquímica de las VLPs purificadas demuestra que contienen las proteínas pVP2, VP2 y VP3, cuando se expresa únicamente la poliproteína viral y las proteínas pVP2, VP2, VP3 y VP1 cuando se realiza la expresión simultánea de la poliproteína y la RNA polimerasa viral (Fernández-Arias, A., Risco, C., Martínez, S., Albar, J. P. & Rodríguez, J. F. (1998). Expression of ORF A1 of infectious bursal disease virus infectious bursal disease virus results in the formation of virus-like particles. *Journal of General Virology* 79: 1047-1054; Martínez-Torrecuadrada, J. L., Castón, J. R., Castro, M., Carrascosa, J. L., Rodríguez, J. F. & Casal, J. I. (2000). Different architectures in the assembly of infectious bursal disease virus capsid proteins expressed in insect cells. *Virology* 278: 322-331; Maraver, A., *et al.*, (2003) citado *supra*; Lombardo, E., Maraver, A., Castón, J. R., Rivera, J., Fernández-Arias, A., Serrano, A., Carrascosa, J. L. & Rodríguez, J. F. (1999). VP1, the putative RNA-dependent RNA polymerase of infectious bursal disease virus, forms complexes with the capsid protein VP3, leading to efficient encapsidation into virus-like particles. *Journal of Virology* 73: 6973-6983).

Por otra parte, la solicitud de patente WO 02/088339 describe unas partículas pseudovirales de IBDV formadas por ensamblaje de proteínas quiméricas que comprenden la poliproteína de IBDV unida en su extremo carboxilo terminal a un polipéptido.

Sin embargo, no se han descrito previamente QVLPs basadas únicamente en pVP2 y VP3 de IBDV, estando esta última proteína VP3 fusionada a un polipéptido de interés, ni su potencial como vehiculizadoras de productos de interés.

5 COMPENDIO DE LA INVENCION

La invención se enfrenta con el problema de proporcionar nuevas herramientas para vectorizar o vehiculizar productos de interés, tales como moléculas con actividad biológica, por ejemplo, fármacos, polipéptidos, proteínas, ácidos nucleicos, etc.

La solución proporcionada por esta invención se basa en que es posible generar, basado en la expresión simultánea de las proteínas pVP2 y VP3 de IBDV, esta última modificada genéticamente para incluir una secuencia de nucleótidos que codifica para un polipéptido heterólogo que comprende un polipéptido de interés, cápsidas vacías quiméricas (QVLPs) de IBDV. Las QVLPs resultantes están formadas por ensamblaje de (i) proteínas pVP2 de IBDV y (ii) proteínas de fusión que comprenden una región A constituida por la proteína VP3 de IBDV unida a una región B constituida por un polipéptido heterólogo que comprende un polipéptido de interés, en donde dicha región B está unida al extremo amino- o carboxi-terminal de dicha proteína VP3 de IBDV. Estas QVLPs pueden ser utilizadas con fines terapéuticos, preventivos, de diagnóstico, etc., por ejemplo, en la elaboración de vacunas o vectores para terapia génica.

Los inventores habían observado previamente que cuando las proteínas VPX (pVP2) y VP3 de IBDV son expresadas a partir de dos genes independientes se forman partículas vacías (VLPs) de IBDV. Estas VLPs son estructuralmente idénticas a las obtenidas mediante expresión de la ORF correspondiente a la poliproteína de IBDV. Como parte del desarrollo de nuevas estrategias de vacunación se analizó la posibilidad de emplear esta estrategia de producción de VLPs de IBDV para la obtención de QVLPs que contuvieran secuencias aminoacídicas heterólogas, correspondientes a péptidos y proteínas de interés, tales como una cola de histidinas (Ejemplo 1), GFP (Ejemplo 2) y finalmente péptidos implicados en la inducción de respuesta inmune (Ejemplo 3). Tal como se demuestra la fusión de secuencias heterólogas en estas construcciones no es un obstáculo para la formación de QVLPs.

Como modelo de estudio de QVLPs transportadoras de péptidos implicados en una respuesta inmune se abordó la posibilidad de obtener QVLPs que contuvieran la secuencia correspondiente al epítipo CD8 (E-CD8) de la proteína CS de malaria (*Plasmodium*

yoelii). Ese epítipo es responsable de la inducción de la respuesta inmune celular CD8-específica frente a ese patógeno, la cual puede ser cuantificada mediante la técnica de ELISPOT en cultivos de esplenocitos de ratones BALB/c (Ejemplo 3).

A modo de resumen, los resultados obtenidos ponen de manifiesto que: (i) el sistema de expresión empleado permite la obtención de QVLPs de IBDV conteniendo 5 secuencias aminoacídicas heterólogas; y (ii) la inmunización con dichas QVLPs de IBDV induce una respuesta inmune específica frente a la secuencia aminoacídica heteróloga presente en las QVLPs.

Por tanto, un aspecto de la presente invención se relaciona con una cápsida vacía 10 quimérica de IBDV caracterizada porque está constituida por ensamblaje de (i) proteínas pVP2 de IBDV y (ii) proteínas de fusión que comprenden una región A constituida por la proteína VP3 de IBDV unida a una región B constituida por un polipéptido heterólogo que comprende un polipéptido de interés.

Un aspecto adicional de esta invención se relaciona con un procedimiento para la 15 producción de dichas QVLPs de IBDV proporcionadas por esta invención, basado en la co-expresión génica de dichas proteínas pVP2 de IBDV y proteínas de fusión como dos genes independientes.

Los ácidos nucleicos, construcciones génicas, sistemas de expresión y células huésped desarrollados para la puesta en práctica de dicho procedimiento de producción de 20 dichas QVLPs de IBDV, así como su empleo para la producción de dichas QVLPs de IBDV, constituyen aspectos adicionales de la presente invención.

Dichas QVLPs de IBDV tienen la capacidad de vectorizar o vehiculizar productos de interés, tales como moléculas con actividad biológica, por ejemplo, fármacos, polipéptidos, proteínas, ácidos nucleicos, etc. En una realización particular, dichas QVLPs 25 de IBDV pueden vehiculizar antígenos e inductores de respuestas inmunes en animales o humanos a los que se suministre, por lo que pueden ser utilizadas en la elaboración de vacunas frente a enfermedades humanas y animales causadas por virus, bacterias, parásitos o cualquier otro tipo de microorganismos o frente enfermedades tumorales. En otra realización particular, dichas QVLPs de IBDV se utilizan en la 30 elaboración de vectores para terapia génica.

Por tanto, en otro aspecto adicional, la presente invención se relaciona con el empleo de dichas QVLPs de IBDV, en la elaboración de medicamentos, tales como

vacunas y vectores para terapia génica. Dichas vacunas y vectores constituyen aspectos adicionales de la presente invención.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

5 **Figura 1.** (a) El diagrama esquematiza los pasos de procesamiento proteolítico necesarios para la formación de las proteínas maduras de la cápsida VP2 y VP3 a partir de la poliproteína precursora. (b) El diagrama refleja diferentes construcciones genéticas derivadas de la poliproteína de IBDV descritas hasta el momento, así como las estructuras producidas mediante su expresión en diferentes sistemas heterólogos. Los números
10 indican la posición correspondiente al primer y último residuo aminoacídico de la poliproteína presente en cada una de las construcciones. La parte inferior de la figura muestra imágenes obtenidas mediante microscopía electrónica de transmisión de las estructuras obtenidas mediante expresión de las diferentes construcciones. La barra corresponde a 50 nm. Los datos han sido tomados de las siguientes referencias:
15 Fernández-Arias *et al.*, (1998), citado *supra*; Maraver *et al.*, (2003), citado *supra*; Martínez-Torrecuadrada *et al.*, (2000), citado *supra*; Castón *et al.*, 2001. C terminus of infectious bursal disease virus major capsid protein VP2 is involved in definition of the t number for capsid assembly. *Journal of Virology* 75, 10815-10828.

Figura 2. Análisis microscópico de células de insecto H5 que coexpresan pVP2
20 **y VP3.** La distribución subcelular de las proteínas pVP2 y VP3 fue analizada mediante inmunomicroscopía confocal. Células infectadas con los rBVs FB/pVP2 (a), FB/VP3 (b), o FBD/pVP2-VP3 (c-e) fueron incubadas con suero de conejo anti-pVP2 y suero de rata anti-VP3. A continuación las células fueron incubadas con suero de cabra anti-Ig de conejo acoplada a Alexa 488 (rojo) y con suero de cabra anti-Ig de rata acoplada a Alexa
25 594 (verde). Los núcleos se tiñeron con To-Pro 3 (azul). (e) Superposición de las imágenes mostradas en los paneles (c) y (d). Imágenes de microscopía electrónica correspondientes a secciones de células H5 infectadas con diferentes construcciones genéticas derivadas de la poliproteína de IBDV. (f) Imagen a baja magnificación de una célula H5 infectada con virus FB parental. El inserto corresponde a un detalle ampliado
30 del area indicada por el recuadro. (g) Imagen a baja magnificación de una célula H5 infectada con el virus FBD/pVPX-VP3. El inserto corresponde a un detalle ampliado del area indicada por el recuadro. (h) Imagen de alta magnificación de una célula H5 infectada con el virus FBD/pVPX-VP3 que muestra en detalle la formación de estructuras de IBDV.

(i) Imagen de alta magnificación de una célula BSC1 infectada con el virus vacunal recombinante VTLacOI/POLY mostrando estructuras similares a las detectadas en el panel (h). Las barras indican 600 nm (paneles f y g) y 200 nm (paneles h é i).

Figura 3. Caracterización estructural y bioquímica de las estructuras derivadas de IBDV producidas en células de insecto co-infectadas con los baculovirus recombinantes (rBV) FB/pVP2 + FB/his-VP3. Células co-infectadas con los rBV FB/pVP2 y FB/his-VP3, o infectadas con el virus FBD/Poly-VP1 o FB/pVP2 fueron empleadas para purificar estructuras derivadas de IBDV mediante centrifugación en gradientes de sacarosa. Los paneles (a), (b), y (c) muestran imágenes de microscopía electrónica de transmisión correspondientes a la fracción 4 de los gradientes obtenidos a partir de las infecciones con FBD/Poly-VP1, FB/pVP2+FB/his-VP3, y FB/pVP2, respectivamente. El panel (d) muestra los resultados de un análisis mediante Western blot de los gradientes de sacarosa correspondientes a cultivos infectados con FBD/Poly-VP1 y FB/pVP2+FB/his-VP3, respectivamente. Los extractos totales (input) y las diferentes fracciones de los gradientes de sacarosa (la fracción F1 corresponde al fondo del gradiente) fueron analizadas mediante Western blot empleando sueros específicos frente a las proteínas VP1, pVP2, VP3, y VP4 de IBDV, respectivamente. Se indica la masa molecular en kDa de los polipéptidos inmunoreactivos.

Figura 4. Caracterización bioquímica y estructural de VLPs de IBDV producidas en *S. cerevisiae* transformadas con el plásmido pESCURA/pVP2-VP3-GFP. Un cultivo de *S. cerevisiae* transformada con el plásmido pESCURA/pVP2-VP3-GFP fue crecido a 30°C en medio suplementado con el inductor galactosa. A las 18 h el cultivo fue recogido y centrifugado. El sedimento resultante fue procesado mediante fraccionamiento en un gradiente lineal 25-50% de sacarosa. A) Análisis bioquímico de muestras correspondientes al sedimento antes de fraccionar (T) así como de las diferentes fracciones del gradiente de sacarosa. Las muestras fueron analizadas mediante SDS-PAGE y western blot empleando anticuerpos específicos frente a las proteínas VP3 (anti-VP3) y pVP2 (anti-pVP2). Las flechas indican las posiciones de las bandas inmunoreactivas correspondientes a las proteínas VP3-GFP (61 kDa) y pVP2 (48 kDa), respectivamente. B) El análisis estructural de las muestras obtenidas fue realizado mediante TEM. La imagen corresponde a una micrografía obtenida a partir de una alícuota correspondiente a la mezcla de las fracciones 7, 8 y 9 del gradiente de sacarosa. La muestra fue teñida con acetato de uranilo y observada mediante TEM. La barra

corresponde a 65 nm. C) Muestra de VLPs obtenidas mediante la expresión de la poliproteína de IBDV en células de mamífero mediante infección con el virus vacunal recombinante VT7/Poly (Fernández-Arias *et al.*, (1998), citado *supra*). La barra corresponde a 65 nm.

5 **Figura 5.- Caracterización estructural y bioquímica de QVLPs-CD8.** El panel A muestra una imagen de TEM de una muestra teñida con acetato de uranilo correspondiente a la fracción 4 de un gradiente de sacarosa empleado para la purificación de estructuras realizado sobre un extracto de células de insecto co-infectadas con los rBVs FB/pVP2 y PF/his-CD8-VP3. La barra indica 100 nm. El panel B muestra el análisis por
10 SDS-PAGE y Western blot, realizado con un anticuerpo frente a la proteína VP3, de una muestra correspondiente a la fracción 4 (QVLPs-CD8) de un gradiente de sacarosa empleado para la purificación de estructuras realizado sobre un extracto de células de insecto co-infectadas con los rBVs FB/pVP2 y PF/his-CD8-VP3 (ver panel A). Como control se empleó una muestra de virus IBDV purificado (IBDV). Se indican los tamaños
15 de los marcadores de masa molecular (MW), así como la masa molecular estimada para las proteínas VP3 y his-CD8-VP3.

Figura 6.- Efecto potenciador de la respuesta inmune celular específica anti-CD8 de malaria mediante la inmunización con QVLPs de IBDV que contienen el epítipo CD8 de *Plasmodium yoelii*. Grupos de 4 ratones de la cepa BALB/c se
20 inocularon intraperitonealmente con 50 µg/ratón de QVLPs-CD8 (grupo IV) o VLPs no quiméricas (grupo III). Como control se inoculó un grupo con VVpJRCS (10⁷ ufp/ratón), un virus vaccinia recombinante que expresa la proteína completa CS de *Plasmodium yoelii* (grupo II). 15 días después, los ratones de todos los grupos se inmunizaron intraperitonealmente con VVpJRCS (10⁷ ufp/ratón). Uno de los grupos recibió en este
25 momento una única dosis del vector viral (grupo I). 15 días después de la segunda inmunización, los animales fueron sacrificados, se extrajo el bazo y se llevó a cabo el ELISPOT frente al péptido CD8 de malaria. El panel A muestra la imagen de los pocillos de ELISPOT realizados con diferentes concentraciones de esplenocitos obtenidos a partir de los ratones pertenecientes a cada uno de los grupos tras su incubación en presencia (+
30 péptido CD8) o ausencia (- péptido CD8) del péptido CD8. El panel B muestra una gráfica de los resultados obtenidos como número de células específicas secretoras de IFN-γ/10⁶ esplenocitos.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

En un primer aspecto, la invención proporciona una cápsida vacía quimérica del virus causante de la enfermedad de la bursitis infecciosa (IBDV), en adelante QVLP de la invención, caracterizada porque está constituida por ensamblaje de (i) proteínas pVP2 de IBDV y (ii) proteínas de fusión que comprenden una región A constituida por la proteína VP3 de IBDV unida a una región B constituida por un polipéptido heterólogo que comprende un polipéptido de interés.

El término "IBDV", tal como se utiliza en la presente invención, se refiere a las diferentes cepas de IBDV pertenecientes a cualquiera de los serotipos (1 ó 2) conocidos [a título ilustrativo véase la revisión realizada por van den Berg TP, Eterradossi N, Toquin D, Meulemans G., en *Rev Sci Tech* 2000 19: 509-43] y los términos "proteína pVP2 de IBDV" y "proteína VP3 de IBDV" se refieren a las diferentes formas de las proteínas pVP2 y VP3 representativas de cualquiera de las mencionadas cepas de IBDV [NCBI protein databank], de acuerdo con la definición realizada por Sánchez y Rodríguez (1999) (Sánchez AB, Rodríguez JF. Proteolytic processing in infectious bursal disease virus: identification of the polyprotein cleavage sites by site-directed mutagenesis. *Virology*. 1999 Sep 15; 262(1):190-199) así como a proteínas sustancialmente homólogas a dichas proteínas pVP2 y VP3 de IBDV, es decir, proteínas cuyas secuencias de aminoácidos tienen un grado de identidad, respecto a dichas proteínas pVP2 y VP3 de IBDV, de, al menos, un 60%, preferentemente de, al menos un 80%, más preferentemente de, al menos, un 90% y, aún más preferentemente de, al menos, un 95%.

La proteína pVP2 de IBDV presente en la QVLP de la invención puede ser cualquier proteína pVP2 representativa de cualquier cepa de IBDV, por ejemplo, la proteína pVP2, longitud completa, de IBDV cepa Soroa [NCBI, número de acceso AAD30136].

La proteína de fusión presente en la QVLP de la invención comprende una región A constituida por la proteína VP3 de IBDV unida a una región B constituida por un polipéptido heterólogo que comprende un polipéptido de interés. En una realización particular, dicha región B está unida a la región amino-terminal o a la región carboxi-terminal de dicha proteína VP3 de IBDV.

La proteína VP3 de IBDV, que constituye la región A de dicha proteína de fusión puede ser cualquier proteína VP3 representativa de cualquier cepa de IBDV, por ejemplo,

la proteína VP3, longitud completa, de IBDV cepa Soroa [NCBI, número de acceso AAD30136].

La región B presente en dicha proteína de fusión está constituida por un polipéptido heterólogo que comprende un polipéptido de interés. Tal como se utiliza en la presente invención el término “polipéptido heterólogo” se refiere a un polipéptido no propio de la cápsida de IBDV nativo. El tamaño del polipéptido de interés puede variar dentro de un amplio intervalo, desde unos pocos aminoácidos hasta cientos de aminoácidos. Dicho polipéptido de interés puede ser prácticamente cualquier polipéptido, independientemente de su origen (eucarótico, procariótico, viral, etc.), susceptible de ser expresado de forma recombinante. No obstante, en una realización particular, dicho polipéptido de interés es un polipéptido útil en vacunación, terapia o diagnóstico, tal como un epítipo o determinante antigénico capaz de inducir una respuesta inmune en animales y humanos frente a enfermedades causadas por virus, bacterias, parásitos o cualquier otro tipo de microorganismos o frente a enfermedades tumorales.

En una realización particular, dicha región B comprende un único polipéptido de interés. Sin embargo, en otra realización particular, dicha región B comprende dos o más polipéptidos de interés, iguales o diferentes, los cuales pueden estar formando tandems.

En una realización particular, dicha proteína de fusión comprende una región A unida a una única región B. En este caso, dicha región B puede estar unida a la región amino-terminal de la VP3 o, alternativamente, a la región carboxi-terminal de VP3, presente en la región A. La región B, tal como se ha mencionado previamente, puede contener uno o más polipéptidos de interés. En una realización particular, dicha región B contiene un único polipéptido de interés mientras que en otra realización particular, dicha región B comprende dos o más polipéptidos de interés diferentes.

En otra realización particular, dicha proteína de fusión comprende una región A unida a dos regiones B, una de ellas unida a la región amino-terminal de la VP3 presente en la región A y la otra a la región carboxi-terminal de VP3 presente en la región A. Dichas regiones B pueden ser iguales o diferentes y cada una de ellas puede contener uno o más polipéptidos de interés, los cuales pueden ser iguales o diferentes entre sí. En una realización concreta, la proteína de fusión comprende una región A unida a una primera región B que contiene un primer polipéptido de interés (B1) y una segunda región B que contiene un segundo polipéptido de interés (B2). Dichos polipéptidos de interés (B1) y (B2) pueden ser iguales o diferentes. En una realización concreta, dichos polipéptidos de

interés (B1) y (B2) son distintos entre sí.

Generalmente, la región A (constituida por la proteína VP3 de IBDV) no está unida directamente a dicha región B (constituida por el polipéptido heterólogo que comprende un polipéptido de interés), sino a través de un polipéptido espaciador (linker) entre dichas regiones A y B. Por tanto, si se desea, la proteína de fusión de la invención puede contener, además, un polipéptido espaciador situado entre dichas regiones A y B. Ventajosamente, dicho polipéptido espaciador es un péptido con flexibilidad estructural, preferentemente, un polipéptido que dé lugar a un dominio no estructurado capaz o no de inducir una respuesta inmune. A modo ilustrativo, dicho péptido flexible puede contener repeticiones de restos de aminoácidos, en particular de Gly y Ser o cualquier otra repetición de restos de aminoácidos adecuada.

Las QVLPs de la invención pueden obtenerse mediante la expresión simultánea de dichas proteínas pVP2 de IBDV y dichas proteínas de fusión que comprenden dichas regiones A y B, en células huésped apropiadas. Dichas células huésped apropiadas son células que contienen la secuencia de nucleótidos codificantes de dicha proteína de fusión que comprende las regiones A y B, y la secuencia de nucleótidos codificante de la pVP2 de IBDV, bien en una única construcción génica o bien en dos construcciones génicas. En una realización particular, dichas células huésped apropiadas son células transformadas, transfectadas o infectadas con un sistema de expresión adecuado, tal como un sistema de expresión que comprende una construcción génica, en donde dicha construcción génica comprende la secuencia de nucleótidos que codifica para dicha proteína de fusión que comprende las regiones A y B, y la secuencia de nucleótidos que codifica para la pVP2 de IBDV, o bien, alternativamente, con un sistema de expresión que comprende una primera construcción génica que comprende la secuencia de nucleótidos que codifica para dicha proteína de fusión que comprende las regiones A y B, y una segunda construcción génica que comprende la secuencia de nucleótidos que codifica para la pVP2 de IBDV.

Por tanto, en otro aspecto, la invención proporciona un ácido nucleico cuya secuencia de nucleótidos comprende la secuencia de nucleótidos que codifica para dicha proteína de fusión que forma parte de las QVLPs de la invención y que comprende una región A constituida por la proteína VP3 de IBDV unida a una región B constituida por un polipéptido heterólogo que comprende un polipéptido de interés, en donde dicha región B unida a la región amino-terminal o a la región carboxi-terminal de dicha proteína VP3 de IBDV. Opcionalmente, el ácido nucleico proporcionado por esta invención puede

contener, si se desea, la secuencia de nucleótidos que codifica para la pVP2 de IBDV. De forma más concreta, en una realización particular, la secuencia del ácido nucleico proporcionado por esta invención comprende (i) una secuencia de nucleótidos que comprende la fase de lectura abierta o región codificante correspondiente a la proteína VP3 de IBDV, y (ii) una secuencia de nucleótidos que comprende la fase de lectura abierta o región codificante de uno o más polipéptidos heterólogos que comprende uno o más polipéptidos de interés y, opcionalmente, si se desea, (iii) una secuencia de nucleótidos que comprende la fase de lectura abierta o región codificante correspondiente a la proteína pVP2 de IBDV.

En otra realización particular, la secuencia del ácido nucleico proporcionado por esta invención comprende una (i) una secuencia de nucleótidos que comprende la fase de lectura abierta o región codificante correspondiente a la proteína VP3 de IBDV, (ii) una primera secuencia de nucleótidos que comprende la fase de lectura abierta o región codificante de uno o más polipéptidos heterólogos que comprende uno o más polipéptidos de interés, (ii') una segunda secuencia de nucleótidos que comprende la fase de lectura abierta o región codificante de uno o más polipéptidos heterólogos que comprende uno o más polipéptidos de interés, en donde dicha segunda secuencia de nucleótidos puede ser igual o diferente a dicha primera secuencia de nucleótidos, y, opcionalmente, si se desea, (iii) una secuencia de nucleótidos que comprende la fase de lectura abierta o región codificante correspondiente a la proteína pVP2 de IBDV. En este caso, una de dichas primera o segunda secuencia de nucleótidos está operativamente unida al extremo 5' de la secuencia de nucleótidos que comprende la fase de lectura abierta o región codificante correspondiente a la proteína VP3 de IBDV y la otra está operativamente unida al extremo 3' de la secuencia de nucleótidos que comprende la fase de lectura abierta o región codificante correspondiente a la proteína VP3 de IBDV.

Tal como se utiliza en esta descripción, el término "fase de lectura abierta correspondiente a la proteína pVP2" o "fase de lectura abierta correspondiente a la proteínas VP3 de IBDV" incluye, además de las secuencias de nucleótidos de dichas fases de lectura abierta, otras fases de lectura abiertas análogas a las mismas codificantes de las proteínas pVP2 y VP3 de IBDV. Asimismo, el término "fase de lectura abierta de uno o más polipéptidos heterólogos que comprenden uno o más polipéptidos de interés" incluye cualquier secuencia de nucleótidos codificante de dicho(s) polipéptido(s) heterólogo(s) que comprende(n) uno o más polipéptidos de interés. El término "análogo", tal como aquí

se utiliza, pretende incluir cualquier secuencia de nucleótidos que puede ser aislada o construida sobre la base de la secuencia de nucleótidos codificantes de pVP2 y VP3 de IBDV, por ejemplo, mediante la introducción de sustituciones de nucleótidos conservativas o no conservativas, incluyendo la inserción de uno o más nucleótidos, la
 5 adición de uno o más nucleótidos en cualquiera de los extremos de la molécula o la delección de uno o más nucleótidos en cualquier extremo o en el interior de la secuencia. En general, una secuencia de nucleótidos análoga a otra secuencia de nucleótidos es sustancialmente homóloga a dicha secuencia de nucleótidos. En el sentido utilizado en esta descripción, la expresión "sustancialmente homóloga" significa que las secuencias de
 10 nucleótidos en cuestión tienen un grado de identidad, a nivel de nucleótidos, de, al menos, un 60%, preferentemente de, al menos, un 80%, más preferentemente de, al menos, un 90% y, aún más preferentemente de, al menos, un 95%.

En otro aspecto, la invención proporciona una construcción génica que comprende un ácido nucleico proporcionado por esta invención, es decir, un ácido nucleico cuya
 15 secuencia comprende la secuencia de nucleótidos que codifica para dicha proteína de fusión que comprende las regiones A y B, y, opcionalmente, la secuencia de nucleótidos que codifica para dicha proteína pVP2 de IBDV. De forma más concreta, en una realización particular, la construcción génica proporcionada por esta invención comprende una secuencia de nucleótidos que comprende (i) una secuencia de nucleótidos que
 20 comprende la fase de lectura abierta o región codificante correspondiente a la proteína VP3 de IBDV y (ii) una secuencia de nucleótidos que comprende la fase de lectura abierta o región codificante de uno o más polipéptidos heterólogos que comprenden uno o más polipéptidos de interés, y, opcionalmente, si se desea, (iii) una secuencia de nucleótidos que comprende la fase de lectura abierta o región codificante correspondiente a la proteína
 25 pVP2 de IBDV. En otra realización particular, la construcción génica proporcionada por esta invención comprende una secuencia de nucleótidos que comprende una (i) una secuencia de nucleótidos que comprende la fase de lectura abierta o región codificante correspondiente a la proteína VP3 de IBDV, (ii) una primera secuencia de nucleótidos que comprende la fase de lectura abierta o región codificante de uno o más polipéptidos
 30 heterólogos que comprende uno o más polipéptidos de interés, (ii') una segunda secuencia de nucleótidos que comprende la fase de lectura abierta o región codificante de uno o más polipéptidos heterólogos que comprende uno o más polipéptidos de interés, en donde dicha segunda secuencia de nucleótidos puede ser igual o diferente a dicha primera

secuencia de nucleótidos, y, opcionalmente, si se desea, (iii) una secuencia de nucleótidos que comprende la fase de lectura abierta o región codificante correspondiente a la proteína pVP2 de IBDV. En este caso, una de dichas primera o segunda secuencia de nucleótidos está operativamente unida al extremo 5' de la secuencia de nucleótidos que comprende la fase de lectura abierta o región codificante correspondiente a la proteína VP3 de IBDV y la otra está operativamente unida al extremo 3' de la secuencia de nucleótidos que comprende la fase de lectura abierta o región codificante correspondiente a la proteína VP3 de IBDV.

En otro aspecto, la invención proporciona un sistema o vector de expresión seleccionado entre:

- a) un sistema de expresión que comprende una construcción génica proporcionada por esta invención, operativamente unida a unos elementos de control de transcripción y, opcionalmente, de traducción, en donde dicha construcción génica comprende la secuencia de nucleótidos que codifica para dicha proteína de fusión que comprende las regiones A y B, y la secuencia de nucleótidos que codifica para la proteína pVP2 de IBDV; y
- b) un sistema de expresión que comprende una primera construcción génica proporcionada por esta invención, operativamente unida a unos elementos de control de transcripción y, opcionalmente, de traducción, en donde dicha primera construcción comprende la secuencia de nucleótidos que codifica para dicha proteína de fusión que comprende las regiones A y B, y una segunda construcción génica, operativamente unida a unos elementos de control de transcripción y, opcionalmente, de traducción, que comprende la secuencia de nucleótidos que codifica para la proteína pVP2 de IBDV.

En una realización particular, el sistema de expresión proporcionado por esta invención comprende una construcción génica que comprende (i) una secuencia de nucleótidos que comprende la fase de lectura abierta o región codificante correspondiente a la proteína VP3 de IBDV, (ii) una secuencia de nucleótidos que comprende la fase de lectura abierta o región codificante de uno o más polipéptidos heterólogos que comprenden uno o más polipéptidos de interés, y (iii) una secuencia de nucleótidos que comprende la fase de lectura abierta o región codificante correspondiente a la proteína pVP2 de IBDV, en donde dicha construcción génica está operativamente unida a unos elementos de control de transcripción y, opcionalmente, de traducción.

En otra realización particular, el sistema de expresión proporcionado por esta invención comprende una primera construcción génica, operativamente unida a unos elementos de control de transcripción y, opcionalmente, de traducción, comprendiendo dicha primera construcción génica (i) una secuencia de nucleótidos que comprende la fase de lectura abierta o región codificante correspondiente a la proteína VP3 de IBDV, y (ii) una secuencia de nucleótidos que comprende la fase de lectura abierta o región codificante de uno o más polipéptidos heterólogos que comprenden uno o más polipéptidos de interés, y una segunda construcción génica, operativamente unida a unos elementos de control de transcripción y, opcionalmente, de traducción, comprendiendo dicha segunda construcción génica una secuencia de nucleótidos que comprende la fase de lectura abierta o región codificante correspondiente a la proteína pVP2 de IBDV.

Los elementos de control de transcripción y, opcionalmente, de traducción, presentes en el sistema de expresión proporcionado por esta invención incluyen promotores, que dirigen la transcripción de las secuencias de nucleótidos de interés (pVP2, VP3 y polipéptido heterólogo) al que está operativamente enlazado, y otras secuencias necesarias o apropiadas para la transcripción y su regulación adecuada en tiempo y lugar, por ejemplo, señales de inicio y terminación, sitios de corte, señal de poliadenilación, origen de replicación, activadores transcripcionales (enhancers), silenciadores transcripcionales (silencers), etc.

Prácticamente cualquier sistema o vector de expresión apropiado puede ser utilizado en la generación del sistema de expresión proporcionado por esta invención. A modo ilustrativo, dichos sistemas o vectores de expresión apropiados pueden seleccionarse de acuerdo con las condiciones y necesidades de cada caso concreto entre plásmidos, bácmidos, cromosomas artificiales de levadura (YACs), cromosomas artificiales de bacteria (BACs), cromosomas artificiales basados en el bacteriófago P1 (PACs), cósmidos, o virus, que pueden contener, además, un origen de replicación heterólogo, por ejemplo, bacteriano o de levadura para que pueda ser amplificado en bacterias o levaduras, así como un marcador utilizable para seleccionar las células transfectadas diferente al gen o genes de interés. Estos sistemas o vectores de expresión pueden ser obtenidos por métodos convencionales conocidos por los técnicos en la materia [Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989). Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory] y forman parte de la presente invención. En una realización particular, dicho sistema o vector de expresión es un

plásmido, tal como un plásmido adecuado para transformar levaduras, por ejemplo, el plásmido denominado pESCURA/pVP2-VP3-GFP (Ejemplo 2), o un virus, tal como un baculovirus recombinante (rBV), por ejemplo, el rBV denominado FBD/pVP2-his-VP3 (Ejemplo 1.2), que expresa durante su ciclo de replicación ambas proteínas (pVP2 de IBDV e his-VP3) simultáneamente en células de insecto, o los rBVs denominados FB/pVP2 y FB/his-VP3 (Ejemplo 1.1) que expresan las proteínas pVP2 de IBDV e his-VP3, respectivamente, cuando co-infectan células de insecto, obteniéndose QVLPs de IBDV con el polipéptido heterólogo de seis histidinas (6 his), o los rBVs denominados FB/pVP2 y FB/his-CD8-VP3 (Ejemplo 3) que expresan las proteínas pVP2 de IBDV e his-CD8-VP3, respectivamente, cuando co-infectan células de insecto, formándose las cápsidas denominadas QVLPs-CD8.

En otro aspecto, la invención proporciona una célula huésped que contiene la secuencia de nucleótidos codificantes de dicha proteína de fusión que comprende las regiones A y B, y la secuencia de nucleótidos codificante de la proteína pVP2 de IBDV, bien en una única construcción génica o bien en dos construcciones génicas diferentes. En una realización particular, dicha célula huésped es una célula huésped transformada, transfectada o infectada con (i) un sistema de expresión proporcionado por esta invención que comprende bien una construcción génica, en donde dicha construcción génica comprende la secuencia de nucleótidos que codifica para dicha proteína de fusión que comprende las regiones A y B, y la secuencia de nucleótidos que codifica para la proteína pVP2 de IBDV, o bien, alternativamente, con (ii) un sistema de expresión que comprende una primera construcción génica que comprende la secuencia de nucleótidos que codifica para dicha proteína de fusión que comprende las regiones A y B, y una segunda construcción génica que comprende la secuencia de nucleótidos que codifica para la proteína pVP2 de IBDV.

En una realización particular, la célula huésped proporcionada por esta invención es una célula huésped transformada, transfectada o infectada con un sistema de expresión que comprende una construcción génica que comprende (i) una secuencia de nucleótidos que comprende la fase de lectura abierta o región codificante correspondiente a la proteína VP3 de IBDV, (ii) una secuencia de nucleótidos que comprende la fase de lectura abierta o región codificante de un polipéptido heterólogo que comprende un polipéptido de interés, y (iii) una secuencia de nucleótidos que comprende la fase de lectura abierta o región codificante correspondiente a la proteína pVP2 de IBDV, en donde dicha

construcción génica está operativamente unida a unos elementos de control de transcripción y, opcionalmente, de traducción.

En otra realización particular, la célula huésped proporcionada por esta invención es una célula huésped transformada, transfectada o infectada con (a) una primera construcción génica, operativamente unida a unos elementos de control de transcripción y, opcionalmente, de traducción, comprendiendo dicha primera construcción génica (i) una secuencia de nucleótidos que comprende la fase de lectura abierta o región codificante correspondiente a la proteína VP3 de IBDV, y (ii) una secuencia de nucleótidos que comprende la fase de lectura abierta o región codificante de un polipéptido heterólogo que comprende un polipéptido de interés, y con (b) una segunda construcción génica, operativamente unida a unos elementos de control de transcripción y, opcionalmente, de traducción, comprendiendo dicha segunda construcción génica una secuencia de nucleótidos que comprende la fase de lectura abierta o región codificante correspondiente a la proteína pVP2 de IBDV.

Prácticamente cualquier célula huésped susceptible de ser transformada, transfectada o infectada por un sistema de expresión proporcionado por esta invención puede ser utilizada, por ejemplo, células de mamífero, células aviares, células de insecto, levaduras, etc.; no obstante, en una realización particular, dicha célula huésped se selecciona entre levaduras y células de insecto. Las levaduras son adecuadas por razones de simplicidad y coste de producción. Las células de insecto son adecuadas cuando el sistema de expresión comprende uno o dos baculovirus recombinantes (rBV). El empleo de rBV es ventajoso por cuestiones de bioseguridad relacionadas con el rango de huésped de los baculovirus, incapaces de replicar en otros tipos celulares que no sean de insecto.

En una realización particular, la invención proporciona una célula huésped, tal como una levadura, por ejemplo, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces pombe*, etc., transformada con un sistema de expresión, tal como un plásmido o un vector de expresión, que comprende una construcción génica proporcionada por esta invención que comprende la secuencia de nucleótidos que codifica para dicha proteína de fusión que comprende las regiones A y B, y la secuencia de nucleótidos que codifica para la proteína pVP2 de IBDV.

En otra realización particular, la invención proporciona una célula huésped, tal como una célula de insecto, infectada con un sistema de expresión, tal como un baculovirus recombinante, que comprende una construcción génica proporcionada por

esta invención que comprende la secuencia de nucleótidos que codifica para dicha proteína de fusión que comprende las regiones A y B, y la secuencia de nucleótidos que codifica para la proteína pVP2 de IBDV.

En otra realización particular, la invención proporciona una célula huésped, tal como una célula de insecto, co-infectada con un sistema de expresión que comprende un primer baculovirus recombinante que comprende una construcción génica proporcionada por esta invención que comprende la secuencia de nucleótidos que codifica para dicha proteína de fusión que comprende las regiones A y B, y con un segundo baculovirus recombinante que comprende una construcción génica proporcionada por esta invención que comprende la secuencia de nucleótidos que codifica para la proteína pVP2 de IBDV.

En otro aspecto, la invención proporciona un procedimiento para la producción de QVLPs de la invención que comprende cultivar una célula huésped proporcionada por esta invención que contiene la secuencia de nucleótidos codificantes de dicha proteína de fusión que comprende las regiones A y B, y la secuencia de nucleótidos codificante de la pVP2 de IBDV, bien en una única construcción génica o bien en dos construcciones génicas diferentes, y que expresa simultáneamente dichas proteínas pVP2 de IBDV y proteína de fusión que comprende dichas regiones A y B, y, si se desea, recuperar dichas QVLPs de la invención. En una realización particular, dicha célula huésped proporcionada por esta invención es una célula transformada, transfectada o infectada con un sistema de expresión adecuado, tal como un sistema de expresión que comprende una construcción génica, en donde dicha construcción génica comprende la secuencia de nucleótidos que codifica para dicha proteína de fusión que comprende las regiones A y B, y la secuencia de nucleótidos que codifica para la pVP2 de IBDV, o bien, alternativamente, con un sistema de expresión que comprende una primera construcción génica que comprende la secuencia de nucleótidos que codifica para dicha proteína de fusión que comprende las regiones A y B, y una segunda construcción génica que comprende la secuencia de nucleótidos que codifica para la pVP2 de IBDV.

Dicho procedimiento comprende, por tanto, la co-expresión génica de dichas proteínas pVP2 de IBDV y dichas proteínas de fusión que comprenden las regiones A y B como dos genes independientes. Tras la expresión simultánea de dichas proteínas (pVP2 de IBDV y las proteínas de fusión que comprenden las regiones A y B) en dichas células, las proteínas expresadas se ensamblan y forman las QVLPs de la invención, las cuales pueden ser aisladas o retiradas del medio, y, si se desea, purificadas. El aislamiento y

purificación de dichas QVLPs de la invención puede realizarse por métodos convencionales, por ejemplo, mediante fraccionamiento en gradientes de sacarosa.

En una realización particular, la co-expresión génica de las proteínas pVP2 de IBDV, y las proteínas de fusión que comprenden dichas regiones A y B, se realiza mediante el empleo de un rBV que permite la expresión simultánea de dichas proteínas a partir de dos genes quiméricos independientes en células de insecto. En este caso, el procedimiento para la producción de QVLPs de la invención, proporcionado por esta invención, comprende, en primer lugar, la obtención de un sistema de expresión génica constituido por un rBV que contiene una construcción génica que codifica simultáneamente para las proteínas pVP2 de IBDV y para dichas proteínas de fusión que comprenden dichas regiones A y B, tal como el rBV denominado FBD/pVP2-his-VP3 (Ejemplo 1.2) o bien, alternativamente, la obtención de un rBV que contiene una construcción genica que codifica para la proteína pVP2 de IBDV y la obtención de otro rBV que contiene una construcción génica que codifica para dicha proteína de fusión que comprende dichas regiones A y B, tal como los rBVs denominados FB/pPV2 y FB/his-VP3 (Ejemplo 1.1), o rBVs denominados FB/pPV2 y FB/his-CD8-VP3 (Ejemplo 3), respectivamente, seguido de la infección de células de insecto con dicho sistema de expresión basado en dicho(s) baculovirus recombinante(s), expresión de las proteínas recombinantes y, si se desea, aislamiento de las QVLPs de la invención formadas por ensamblaje de dichas proteínas pVP2 de IBDV y proteínas de fusión que comprenden dichas regiones A y B, y, opcionalmente, purificación posterior de dichas QVLPs de la invención.

La construcción de un baculovirus recombinante que permite la expresión de forma independiente de las proteínas pVP2 de IBDV y las proteínas de fusión que comprenden dichas regiones A y B se puede realizar por cualquier experto en la materia en base a lo aquí descrito y al estado de la técnica sobre esta tecnología (Cold Spring Harbor, N.Y.; Leusch MS, Lee SC, Olins PO. 1995. A novel host-vector system for direct selection of recombinant baculoviruses (bacmids) in *Escherichia coli*. *Gene* 160: 191-4; Luckow VA, Lee SC, Barry GF, Olins PO. 1993. Efficient generation of infectious recombinant baculoviruses by site-specific transposon-mediated insertion of foreign genes into a baculovirus genome propagated in *Escherichia coli*. *J Virol* 67: 4566-79).

En otra realización particular, la co-expresión génica de las proteínas pVP2 de IBDV y de las proteínas de fusión que comprenden las regiones A y B previamente

definidas, se realiza mediante el empleo de un vector que permite la expresión de dichas proteínas en células de levadura. En este caso, el procedimiento para la producción de QVLPs de la invención, proporcionado por esta invención, comprende, en primer lugar, la obtención de un sistema de expresión génica constituido por un plásmido que contiene una construcción génica que codifica simultáneamente para las proteínas pVP2 de IBDV y para dichas proteínas de fusión que comprenden dichas regiones A y B, seguido de la transformación de levaduras con dicho sistema de expresión, expresión de las proteínas recombinantes y, si se desea, aislamiento de las QVLPs de la invención formadas por ensamblaje de dichas proteínas pVP2 de IBDV y proteínas de fusión que comprenden dichas regiones A y B, y, opcionalmente, purificación posterior de dichas QVLPs de la invención. En una realización concreta, el sistema de expresión adecuado para transformar levaduras está basado en un sistema de expresión pESC Yeast (Stratagene) tal como, por ejemplo, el plásmido pESCURA/pVP2/VP3-GFP (Ejemplo 2) que contiene una construcción génica que codifica para las proteínas pVP2 de IBDV y VP3-GFP.

La obtención de levaduras transformadas con una construcción génica o con un sistema o vector de expresión apropiado que permite la expresión simultánea de las proteínas pVP2 de IBDV y las proteínas de fusión que comprenden dichas regiones A y B, se puede realizar por cualquier experto en la materia en base a lo aquí descrito y al estado de la técnica sobre esta tecnología (pESC epitope tagging vectors Instructions manual. Stratagene www.stratagene.com; Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989). Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory).

En otro aspecto, la invención se relaciona con el empleo del sistema de expresión génica proporcionado por esta invención para la producción y obtención de QVLPs de la invención.

Las QVLPs de la invención pueden ser utilizadas como vectores o vehiculizadores de productos de interés, tales como moléculas con actividad biológica, por ejemplo, fármacos, polipéptidos, proteínas, ácidos nucleicos, etc., por lo que pueden ser utilizadas con fines terapéuticos, de diagnóstico o de investigación. En una realización particular, dichas moléculas de interés biológico incluyen polipéptidos de interés, tales como antígenos o inductores de respuestas inmune en animales o humanos a los que se suministre, o bien incluyen secuencias de ácido nucleico, útiles en terapia génica, destinadas a ser introducidas en el interior de las células apropiadas.

Por tanto, en otro aspecto, la invención se relaciona con el empleo de las QVLPs de la invención en la elaboración de medicamentos, por ejemplo, vacunas, vectores para terapia génica (delivery systems), etc. En una realización particular, dicho medicamento es una vacuna destinada a conferir protección frente a enfermedades humanas o animales causadas por virus, bacterias, parásitos o cualquier otro tipo de microorganismos, o frente a enfermedades tumorales. En otra realización particular, dicho medicamento es un vector para terapia génica.

En otro aspecto, la invención proporciona una vacuna que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de QVLPs de la invención, junto con, opcionalmente, uno o más adyuvantes y/o vehículos farmacéuticamente aceptables. Dicha vacuna es útil para proteger animales y humanos frente a enfermedades causadas por microorganismos (virus, bacterias, parásitos, etc.), o frente a enfermedades tumorales. En una realización particular, dicha vacuna resulta especialmente útil para proteger animales y humanos simultáneamente frente a la infección causada por dos o más agentes infecciosos causantes de enfermedades. A modo ilustrativo, la vacuna proporcionada por esta invención puede ser utilizada para proteger aves, por ejemplo, pollos, pavos, ocas, gansos, faisanes, codornices, avestruces, etc., frente al virus causante de la bursitis infecciosa (IBDV) y frente a uno o más agentes infecciosos responsables de enfermedades aviares (patógenos aviares).

En el sentido utilizado en esta descripción, la expresión "cantidad terapéuticamente efectiva" se refiere a la cantidad de QVLPs de la invención calculada para producir el efecto deseado y, en general, vendrá determinada, entre otras causas, por las características propias de las QVLPs y el efecto de inmunización a conseguir.

Los adyuvantes y vehículos farmacéuticamente aceptables que pueden ser utilizados en dichas vacunas son los adyuvantes y vehículos conocidos por los técnicos en la materia y utilizados habitualmente en la elaboración de vacunas.

En una realización particular, dicha vacuna se prepara en forma de una solución o suspensión acuosa, en un diluyente farmacéuticamente aceptable, tal como solución salina, solución salina tamponada con fosfato (PBS), o cualquier otro diluyente farmacéuticamente aceptable.

La vacuna proporcionada por esta invención puede ser administrada por cualquier vía de administración apropiada que dé como resultado una respuesta inmune protectora frente a la secuencia heteróloga o epítipo utilizado, para lo cual dicha vacuna se formulará

en la forma farmacéutica adecuada a la vía de administración elegida. En una realización particular, la administración de la vacuna proporcionada por esta invención se efectúa por vía parenteral, por ejemplo, por vía intraperitoneal, subcutánea, etc.

Los siguientes ejemplos ilustran la invención y no deben ser considerados en sentido limitativo de la misma.

EJEMPLO 1

Obtención de QVLPs de IBDV en células de insecto

1.1 Obtención de QVLPs de IBDV, VP2-his-VP3, mediante dos rBVs independientes en células de insecto

En este ejemplo se describen los resultados de una serie de experimentos diseñados para analizar la posibilidad de obtener QVLPs de IBDV a partir de la coexpresión de las proteínas pVP2 y VP3 de IBDV y un péptido heterólogo a partir de dos genes quiméricos independientes. Para ello, se han utilizado dos baculovirus recombinantes (rBVs) descritos previamente, FB/his-VP3 (Kochan, G., González, D. & Rodríguez, J. F. (2003). Characterization of the RNA binding activity of VP3, a major structural protein of IBDV. *Archives of Virology* 148, 723-744) y FB/VPX, aquí citado como FB/pVP2, (Martínez-Torrecuadrada, J. L., Castón, J. R., Castro, M., Carrascosa, J. L., Rodríguez, J. F. & Casal, J. I. (2000). Different architectures in the assembly of infectious bursal disease virus capsid proteins expressed in insect cells. *Virology* 278, 322-331). Estos rBVs fueron generados mediante el clonaje en vectores apropiados de los DNA complementarios (cDNAs) codificadores de las proteínas pVP2 y pVP3 de IBDV. Dichos cDNAs fueron obtenidos por RT-PCR a partir del segmento A del genoma de IBDV serotipo I cepa Soroa (número de acceso al NCBI, AAD30136). El rBV FB/his-VP3 expresa una proteína VP3 quimérica que en su extremo N-terminal contiene un tandem de 6 histidinas fusionadas a la secuencia de VP3 (Met754-Glu1012 de la poliproteína) denominada his-VP3. El rBV FB/pVP2 expresa la región codificadora de la proteína pVP2 (Met1-Ala512).

El análisis de la expresión de estas proteínas pVP2 y his-pVP3, bien de forma independiente o conjunta, se realizó en cultivos celulares. Para la realización de estos experimentos, se utilizaron cultivos en monocapa de células procedentes del insecto *Trichoplusia ni* (H5, Invitrogen) que fueron crecidos sobre cubreobjetos de cristal. Dichos cultivos fueron infectados independientemente con FB/pVP2, FB/his-VP3, o co-infectados con ambos rBVs. La multiplicidad de infección fue de 5 ufp/célula. A las 48

horas después de la infección (hpi) las células fueron fijadas, e incubadas con sueros policlonales de conejo anti-VP2 y policlonales de rata anti-VP3 (Fernández-Arias, A., Risco, C., Martínez, S., Albar, J. P. & Rodríguez, J. F. (1998). Expression of ORF A1 of infectious bursal disease virus infectious bursal disease virus results in the formation of virus-like particles. *Journal of General Virology* 79, 1047-1054). Después de sucesivos lavados, los cubreobjetos fueron incubados con sueros de cabra anti-rata conjugado con Alexa 594 y de cabra anti-conejo conjugado a Alexa 488 (Jackson Immunoresearch Laboratories, Inc.). Los núcleos celulares fueron teñidos con el marcador específico To-Pro-3 (Molecular Probes, Inc.). Finalmente, las muestras se visualizaron por epifluorescencia con un microscopio Zeiss Axiovert 200 equipado con el sistema confocal Bio Rad Radiance 2100. Las imágenes obtenidas se almacenaron utilizando el equipo de software Laser Sharp Package (Bio Rad). Como se muestra en la Figura 2a, en los cultivos infectados con FB/pVP2 el suero anti-VP2 mostró una señal granular fina mezclada con estructuras tubulares ambas distribuidas en todo el citoplasma. La señal anti-VP3, detectada en las células infectadas con el rBV FB/his-VP3, se caracterizó por la presencia de acumulaciones de forma esférica alrededor del núcleo y aparentemente huecas. En los cultivos coinfectados con ambos virus recombinantes se detectó una notable modificación en el patrón de distribución de ambas proteínas. En estas células, las señales específicas de pVP2 y VP3 se colocaron en acumulaciones esféricas y densas, sugiriendo que su coexpresión permitía la formación de complejos pVP2/his-VP3 (Figura 2c a la 2e).

Con la intención de caracterizar estas estructuras en mayor detalle, extractos similares, correspondientes a células infectadas con FB/pVP2+FB/hisVP3 fueron analizados por microscopía electrónica de transmisión (TEM). Como control, y en paralelo, se analizaron por la misma técnica cultivos de células H5 infectadas con la cepa silvestre del virus FBD (FastBacDual, Invitrogen). Después de la infección, las células fueron recogidas a las 48 h, y procesadas como se ha descrito previamente (Fernández-Arias, A., Risco, C., Martínez, S., Albar, J. P. & Rodríguez, J. F. (1998). Expression of ORF A1 of infectious bursal disease virus infectious bursal disease virus results in the formation of virus-like particles. *Journal of General Virology* 79: 1047-1054) para su análisis en cortes ultrafinos por TEM. Como se muestra en la Figura 2, el citoplasma de las células coinfectadas contiene agregados formados por una mezcla de túbulos y estructuras similares a cápsidas (Figura 2g, 2h y 2i). Estos agregados no fueron observados en ningún caso en las muestras correspondientes a células infectadas con el

virus silvestre FBD (Figura 2f). El aspecto y el tamaño de los túbulos, así como de las estructuras similares a cápsidas fue semejante a los descritos previamente en cultivos celulares infectados con VT7/Poly, un recombinante del virus vaccinia que expresa el gen de la poliproteína de IBDV (Fernández-Arias, A., Risco, C., Martínez, S., Albar, J. P. & Rodríguez, J. F. (1998). Expression of ORF A1 of infectious bursal disease virus results in the formation of virus-like particles. *Journal of General Virology* 79: 1047-1054).

Para establecer de forma inequívoca que la coexpresión de pVP2 y his-VP3 permitía el ensamblaje y, por tanto, la obtención de QVLPs, se decidió purificar las partículas formadas. Para ello, se infectaron con FB/pVP2+FB/his-VP3 cultivos de células H5. 60 hpi, las células se homogeneizaron y los extractos se separaron en gradientes de sacarosa tal y como se ha descrito previamente (Lombardo, E., Maraver, A., Castón, J. R., Rivera, J., Fernández-Arias, A., Serrano, A., Carrascosa, J. L. & Rodríguez, J. F. (1999). VP1, the putative RNA-dependent RNA polymerase of infectious bursal disease virus, forms complexes with the capsid protein VP3, leading to efficient encapsidation into virus-like particles. *Journal of Virology* 73, 6973-6983). Después de su centrifugación, los gradientes fueron fraccionados, y las distintas fracciones fueron analizadas por TEM como se ha descrito previamente (Lombardo, E., Maraver, A., Castón, J. R., Rivera, J., Fernández-Arias, A., Serrano, A., Carrascosa, J. L. & Rodríguez, J. F. (1999). VP1, the putative RNA-dependent RNA polymerase of infectious bursal disease virus, forms complexes with the capsid protein VP3, leading to efficient encapsidation into virus-like particles. *Journal of Virology* 73, 6973-6983). Como control, y sujetos al mismo procedimiento, se fraccionaron gradientes correspondientes a extractos de células infectadas con el rBV FB/VPX o con el rBV FBD/Poly-VP1. El virus recombinante FBD/Poly-VP1 expresa simultáneamente la poliproteína y el polipéptido VP1. Como era predecible, la infección con FBD/Poly-VP1 tenía como resultado una eficiente producción de VLPs (Maraver, A., Oña, A., Abaitua, F., González, D., Clemente, R., Diaz-Ruiz, A., Caston, J. R., Pazos, F. & Rodríguez, J. F. (2003). The oligomerization domain of VP3, the scaffolding protein of infectious bursal disease virus, plays a critical role for capsid formation. *Journal of Virology* 77:6438-49). Por otra parte, las fracciones correspondientes a las células infectadas con FB/VPX sólo contenían túbulos de aspecto retorcido. Los gradientes correspondientes a células coinfectadas con los rBVs FB/pVP2+FB/his-VP3 contenían túbulos rígidos de tipo I en las fracciones cercanas al

fondo del gradiente, y QVLPs en las centrales y en las fracciones superiores (Figura 3b). Las QVLPs aisladas de las células co-infectadas con rBV FB/pVP2+FB/his-VP3 tenían un diámetro de 65-70 nm, así como un contorno poligonal característico, absolutamente indistinguible de las VLPs purificadas de cultivos infectados con FBD/Poly-VP1 (Maraver, A., Oña, A., Abaitua, F., González, D., Clemente, R., Diaz-Ruiz, A., Caston, J. R., Pazos, F. & Rodríguez, J. F. (2003). The oligomerization domain of VP3, the scaffolding protein of infectious bursal disease virus, plays a critical role for capsid formation. *Journal of Virology* 77:6438-49) o de los cultivos infectados con VT7/Poly (Fernández-Arias, A., Risco, C., Martínez, S., Albar, J. P. & Rodríguez, J. F. (1998). Expression of ORF A1 of infectious bursal disease virus infectious bursal disease virus results in the formation of virus-like particles. *Journal of General Virology* 79, 1047-1054).

Con la intención de conseguir una caracterización bioquímica del material obtenido, se realizaron experimentos de western-blot en los que las distintas fracciones se enfrentaron a sueros específicos contra las proteínas VP1, pVP2, VP3 y VP4 (Fernández-Arias *et al.* 1998, citado *supra*; Lombardo *et al.*, 1999). Como control se utilizaron extractos de células infectadas con IBDV. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 3d. Como se esperaba, las bandas correspondientes a los polipéptidos VP1 y VP4 sólo fueron detectadas en muestras correspondientes a células infectadas con FBD/Poly-VP1. Los patrones correspondientes a pVP2/VP3 en muestras correspondientes a células infectadas con FBD/Poly-VP1 o coinfectadas con FB/VPX+ FB/his-VP3 fueron similares, detectándose dos bandas correspondientes a pVP2 y VP3, respectivamente.

1.2 Obtención de QVLPs de IBDV, pVP2-his-VP3, mediante un único rBV en células de insecto

Además, se procedió a la construcción del plásmido pFBD/pVP2-his-VP3. El primer paso de la construcción se realizó mediante el clonaje de la región codificante de la proteína pVP2 en el vector pFBDual (Invitrogen). El fragmento de DNA correspondiente a pVP2 se obtuvo mediante PCR con los oligonucleótidos identificados como Oligo I (SEQ ID NO: 1) y Oligo II (SEQ ID NO: 2) empleando como molde el plásmido pVOTE.2/Poly (Fernández-Arias, A., Risco, C., Martínez, S., Albar, J. P. & Rodríguez, J. F. (1998). Expression of ORF A1 of infectious bursal disease virus infectious bursal disease virus results in the formation of virus-like particles. *Journal of General Virology*

79, 1047-1054). El fragmento fue purificado, sometido a digestión con los enzimas BglII y HindIII y clonado en el vector pFBDual (Invitrogen) previamente digerido con los enzimas BamHI y HindIII. El plásmido resultante se denominó pFBD/pVP2. A continuación, se obtuvo un fragmento de DNA conteniendo la fase de lectura abierta correspondiente a la proteína VP3 mediante digestión del plásmido pFB/his-VP3 (Kochan et al., 2003, citado *supra*) con el enzima RsrII, tratamiento con Klenow, y posterior restricción con KpnI. Este fragmento de DNA fue purificado y clonado en el plásmido pFBD/pVP2 previamente digerido con los enzimas SmaI y KpnI. El plásmido resultante se denominó pFBD/pVP2-his-VP3 (SEQ ID NO: 3) y contiene la secuencia de nucleótidos codificante de las proteínas pVP2 y de la proteína de fusión his-VP3 que contiene una secuencia heteróloga de 6 his (esta última está codificada por la cadena complementaria a los nucleótidos 6734-7585 de la SEQ ID NO: 3). La secuencia de aminoácidos de la proteína pVP2 y de la proteína de fusión his-VP3 (pVP2-his-VP3) codificada por la secuencia de nucleótidos contenida en dicho plásmido pFBD/pVP2-his-VP3 se muestra en la SEQ ID NO: 4.

El plásmido pFBD/pVP2-his-VP3 permitió la obtención de un rBV, denominado FBD/pVP2-his-VP3, que expresa durante su ciclo de replicación ambas proteínas simultáneamente [<http://invitrogen.com/content/sfs/manuals/bevtest.pdf>].

Los resultados obtenidos con FBD/pVP2-his-VP3 en células de insecto son idénticos a los obtenidos mediante la coinfección con los rBVs FB/pVP2 y FD/his-VP3, obteniéndose QVLPs de IBDV con el péptido heterólogo de seis histidinas (6his).

EJEMPLO 2

Obtención de QVLPs de IBDV, pVP2-VP3-GFP, en levaduras

Con el fin de estudiar la posibilidad de obtener QVLPs de IBDV en cultivos de levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) se generó el vector pESCURA/pVP2-VP3-GFP con el gen heterólogo GFP unido al extremo N-terminal de VP3. El primer paso en la construcción del vector se realizó mediante el clonaje de la región codificante de la proteína pVP2 en el vector pESCURAinv. El plásmido pESCURAinv se generó mediante digestión del vector pRS426 (Stratagene) con el enzima PvuII y religación de la mezcla de digestión. El vector resultante, pESCURAinv, contiene la región de clonaje múltiple en posición invertida con respecto a la del vector parental pRS426. El fragmento de DNA correspondiente a la proteína pVP2 se obtuvo mediante PCR con los oligonucleótidos

identificados como Oligo III (SEQ ID NO: 5) y Oligo IV (SEQ ID NO: 6) empleando como molde el plásmido pVOTE.2/Poly (Fernández-Arias, A., Risco, C., Martínez, S., Albar, J. P. & Rodríguez, J. F. (1998). Expression of ORF A1 of infectious bursal disease virus infectious bursal disease virus results in the formation of virus-like particles. *Journal of General Virology* 79, 1047-1054). El fragmento fue purificado, sometido a digestión con los enzimas BglII y HindIII y clonado en el vector pESCURA.inv previamente digerido con los enzimas BamHI y HindIII. El plásmido resultante se denominó pESCURA/pVP2.

El plásmido pFB/VP3-GFP fue construido en dos etapas. La primera consistió en el clonaje de una fragmento de DNA, generado mediante PCR, que contiene la ORF de la proteína VP3 carente del codón de terminación. Este PCR se realizó utilizando los oligonucleótidos identificados como Oligo V (SEQ ID NO: 9) y Oligo VI (SEQ ID NO: 10) y empleando como molde el plásmido pVOTE.2/Poly (Fernández-Arias, A., Risco, C., Martínez, S., Albar, J. P. & Rodríguez, J. F. (1998). Expression of ORF A1 of infectious bursal disease virus results in the formation of virus-like particles. *Journal of General Virology* 79, 1047-1054). El DNA resultante fue digerido con los enzimas EcoRI y BamHI y clonado en el vector pEGFP-N3 (Clontech) también digerido con los mismos enzimas. El plásmido resultante se denominó pVP3-GFP. A continuación, el plásmido pEGFP-GFP fue digerido con los enzimas EcoRI y NotI y clonado en el vector pFastBac1 (Invitrogen). El plásmido resultante se denominó pFB/VP3-GFP.

Seguidamente, se obtuvo un fragmento de DNA que contenía la fase de lectura abierta correspondiente a la proteína VP3 fusionada a la región codificante de la proteína EGFP mediante digestión del plásmido pFB/VP3-GFP con los enzimas EcoRI y NotI. Este fragmento de DNA fue purificado y clonado en el plásmido pESCURA/pVP2 previamente digerido con los enzimas EcoRI y NotI. El plásmido resultante se denominó pESCURA/pVP2-VP3-GFP (SEQ ID NO: 7) y contiene las ORFs de la proteína pVP2 y VP3-GFP bajo el control transcripcional de dos promotores independientes, GAL 1 y GAL 10, ambos inducibles por galactosa (la proteína pVP2 está codificada por la cadena nucleótidos complementaria a los nucleótidos 5862-7343 de la SEQ ID NO: 7). La secuencia de aminoácidos de la proteína pVP2 y de la proteína de fusión VP3-GFP (pVP2-VP3-GFP) codificada por la secuencia de nucleótidos contenida en dicho plásmido pESCURA/pVP2-VP3-GFP se muestra en la SEQ ID NO: 8.

Posteriormente, pESCURA/pVP2-VP3-GFP se empleó para transformar un cultivo

de la levadura *S. cerevisiae* haploide cepa 499 según un protocolo previamente descrito (Gietz, R.D. and R.A. Woods. (2002) Transformation of yeast by the Liac/SS carrier DNA/PEG method. *Methods in Enzymology* 350: 87-96). Las levaduras transformadas con el plásmido fueron seleccionadas mediante crecimiento en placas de medio SC (CSM + YNB, glucosa 2% y bacto agar) suplementadas con los aminoácidos triptófano, leucina e histidina y carentes de uracilo (-Ura). Tras una incubación de 48 h a 30°C, se seleccionó una colonia que fue empleada para la realización de los subsiguientes análisis de expresión de proteínas y formación de QVLPs.

El análisis de la expresión de las proteínas pVP2 y VP3 y formación de QVLPs se realizó siguiendo un protocolo descrito previamente para la caracterización de VLPs de IBDV en otros sistemas de expresión (Fernández-Arias, A., Risco, C., Martínez, S., Albar, J. P. & Rodríguez, J. F. (1998). Expression of ORF A1 of infectious bursal disease virus results in the formation of virus-like particles. *Journal of General Virology* 79, 1047-1054; Lombardo, E., Maraver, A., Castón, J. R., Rivera, J., Fernández-Arias, A., Serrano, A., Carrascosa, J. L. & Rodríguez, J. F. (1999). VP1, the putative RNA-dependent RNA polymerase of infectious bursal disease virus, forms complexes with the capsid protein VP3, leading to efficient encapsidation into virus-like particles. *Journal of Virology* 73, 6973-698). La colonia seleccionada fue cultivada en medio líquido CSM (-Ura) + YNB suplementado con rafinosa al 2%. El cultivo se incubó a 30°C durante 24 h. Este cultivo fue empleado para inocular, a una densidad óptica (D.O.) de 0,2, un matraz de 200 ml de medio CSM (-Ura) + YNB suplementado con el inductor galactosa al 2%. El cultivo fue mantenido a 30°C durante 18 horas (hasta una D.O. entre 1,0 y 2,0). Las levaduras fueron centrifugadas a 3000 rpm, 5 min a 4°C, se lavaron con agua destilada 1 vez, y el pellet fue resuspendido en tampón de lisis (TEN: Tris 10 mM, pH 8,0; NaCl 150 mM; EDTA 1 mM) + inhibidores de proteasas 2X (Compl Roche). Para la lisis se añadió 1 volumen de "glass beads" (cuentas o perlas de vidrio) de un tamaño aproximado de 425-600 micrones (Sigma). Esta mezcla fue sometida al vortex vigoroso durante 30 segundos 4 veces, con intervalos de 30 segundos, y todo ello a 4°C. Tras ello se recuperó la fracción soluble por centrifugación de la mezcla de lisis a 13.000 rpm durante 15 min a 4°C. Esta muestra fue sometida a fraccionamiento en un gradiente de sacarosa de acuerdo al protocolo previamente descrito (Lombardo, E., Maraver, A., Castón, J. R., Rivera, J., Fernández-Arias, A., Serrano, A., Carrascosa, J. L. & Rodríguez, J. F. (1999). VP1, the putative RNA-dependent RNA polymerase of infectious bursal disease virus, forms complexes

with the capsid protein VP3, leading to efficient encapsidation into virus-like particles. *Journal of Virology* 73, 6973-6983). Las muestras obtenidas tras el fraccionamiento así como una muestra del material de partida fueron analizadas mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE) [Current Protocols in Molecular Biology] e inmunodetección por Western blot (Figura 4A) empleando sueros anti-pVP2 y anti-VP3 [Current Protocols in Molecular Biology]. Como se muestra en la Figura 4A, el Western blot reveló la presencia de bandas, con la masa molecular predicha correspondiente a las proteínas pVP2 (48 kDa) y VP3-GFP (61 kDa), así como otras bandas inmunoreactivas de menor tamaño producidas probablemente por degradación proteolítica tanto en la muestra inicial como en las diferentes fracciones del gradiente. Estos resultados demostraron de forma fehaciente la correcta expresión de ambos polipéptidos en el cultivo de *S. cerevisiae* transformado con el plásmido pESCURA/pVP2-VP3. A continuación, las distintas fracciones del gradiente fueron analizadas mediante TEM como se ha descrito previamente (Lombardo, E., Maraver, A., Castón, J. R., Rivera, J., Fernández-Arias, A., Serrano, A., Carrascosa, J. L. & Rodríguez, J. F. (1999). VP1, the putative RNA-dependent RNA polymerase of infectious bursal disease virus, forms complexes with the capsid protein VP3, leading to efficient encapsidation into virus-like particles. *Journal of Virology* 73:, 6973-6983). Como se muestra en la Figura 4B, el análisis mediante TEM de las fracciones del gradiente reveló la existencia de QVLPs de IBDV en las fracciones superiores del gradiente. Estas QVLPs presentan un diámetro de 65-70 nm y un contorno poligonal indistinguible de las VLPs de IBDV obtenidas en otros sistemas de expresión (Figura 4C).

EJEMPLO 3

25 Obtención y caracterización de la inmunogenicidad de QVLPs de IBDV

Como parte del desarrollo de nuevas estrategias de vacunación se analizó la posibilidad de emplear esta estrategia de producción de VLPs quiméricas (QVLPs) de IBDV que contuvieran secuencias aminoacídicas heterólogas, correspondientes a otras proteínas o péptidos implicados en la inducción de una respuesta inmune. Como modelo de estudio se abordó la posibilidad de obtener QVLPs que contuvieran, como polipéptido heterólogo que comprende un polipéptido de interés, la secuencia de aminoácidos correspondiente al epítipo CD8 (E-CD8) de la proteína CS de malaria (*Plasmodium yoelii*). Quantification of antigen specific CD8+ T cells using an ELISPOT assay. J

- Immunol Methods 181: 45-54; Zavala, F., Rodrigues, M., Rodriguez, D., Rodriguez, J. R., Nussenzweig, R. S. and Esteban, M. (2001). A striking property of recombinant poxviruses: efficient inducers of in vivo expansion of primed CD8(+) T cells. *Virology* 280: 155-159). Este epítipo es responsable de la inducción de la respuesta inmune celular CD8-específica frente a este patógeno (Oliveira-Ferreira J, Miyahira Y, Layton GT, Savage N, Esteban M, Rodriguez D, Rodriguez JR, Nussenzweig RS, Zavala F, Miyahira Y. (2000). Immunogenicity of Ty-VLP bearing a CD8(+) T cell epitope of the CS protein of *P. yoelii*: enhanced memory response by boosting with recombinant vaccinia virus. *Vaccine* 18: 1863-1869). Esta respuesta puede ser cuantificada mediante la técnica de ELISPOT (Miyahira Y, Murata K, Rodriguez D, Rodriguez JR, Esteban M, Rodrigues MM, Zavala F. (1995) Quantification of antigen specific CD8+ T cells using an ELISPOT assay. *J Immunol Methods* 181: 45-54) en cultivos de esplenocitos de ratones BALB/c.

Con este fin, se realizó la construcción del plásmido pFB/his-CD8-VP3. (SEQ ID NO: 13) siguiendo la estrategia de clonaje descrita más adelante. Este vector fue construido mediante inserción de un fragmento de DNA de 36 bp, generado mediante hibridación de los oligonucleótidos sintéticos identificados como CD8 A (SEQ ID NO: 11) y CD8 B (SEQ ID NO: 12), que contiene la secuencia codificadora del epítipo CD8 (SYVPSAEQI, ver los residuos 29 a 37 de las SEQ ID NO: 13 y 14) de la proteína CS de malaria en la ORF que codifica la proteína his-VP3 integrada en el vector pFB/his-VP3. El clonaje se realizó mediante ligación del fragmento de DNA generado mediante hibridación de los oligonucleótidos sintéticos CD8 A y B (SEQ ID NO: 11 y SEQ ID NO: 12) al plásmido pFB/his-VP3 digerido con el enzima de restricción *EheI*. Este plásmido pFB/his-CD8-VP3 (SEQ ID NO: 13) contiene una ORF que codifica una proteína de fusión denominada his-CD8-VP3 que contiene el epítipo CD8 insertado en el extremo correspondiente a la secuencia N-terminal de la ORF de proteína his-VP3. La secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión his-CD8-GFP codificada por la secuencia de nucleótidos contenida en dicho plásmido pFB/his-CD8-VP3 se muestra en la SEQ ID NO: 14.

El plásmido pFB/his-CD8-VP3 fue purificado y empleado para generar el correspondiente baculovirus recombinante (rBV), denominado FB/his-CD8-VP3, siguiendo la tecnología Bac-to-Bac de acuerdo con los protocolos descritos por el fabricante (Invitrogen BV, Groningen, The Netherlands).

3.1 Producción de QVLPs

Cultivos de células H5 fueron infectados simultáneamente con los baculovirus recombinantes FB/His-CD8-VP3 y FB/pVP2. El rBV FB/ pVP2 (véase el Ejemplo 1.1) expresa la región correspondiente a la proteína pVP2 (Met1-Ala 512) de la poliproteína de IBDV. A las 48 horas post-infección (pi) las células fueron recogidas y los extractos correspondientes sometidos al protocolo de purificación de VLPs de IBDV mediante fraccionamiento en gradientes lineales de sacarosa (Lombardo, E., Maraver, A., Castón, J. R., Rivera, J., Fernández-Arias, A., Serrano, A., Carrascosa, J. L. & Rodríguez, J. F. (1999). VP1, the putative RNA-dependent RNA polymerase of infectious bursal disease virus, forms complexes with the capsid protein VP3, leading to efficient encapsidation into virus-like particles. *Journal of Virology* 73: 6973-6983). Cada una de las fracciones obtenidas fue visualizada mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM) y analizada mediante SDS-PAGE e inmunoblot empleando un anticuerpo específico frente a VP3. Como se observa en la Figura 5A, la fracción 4 del gradiente contenía abundantes ensamblados con una estructura idéntica (perímetro poligonal y un diámetro de 65-70 nm) a las VLPs de IBDV obtenidas mediante expresión de la poliproteína viral. La caracterización bioquímica, mediante SDS-PAGE y Western blot (Figura 5B), demostró que estas QVLPs contienen una proteína, inmunoreactiva frente al suero anti-VP3, cuya masa molecular (33,5 kDa) es idéntica a la predicha para la proteína de fusión his-CD8-VP3 (33,591 kDa). Estos resultados permiten concluir que la co-expresión de los genes pVP2 e his-CD8-VP3 en células de insecto da lugar a la formación de VLPs quiméricas (QVLPs) que contienen la proteína de fusión his-CD8-VP3. Estas QVLPs se denominaron QVLPs-CD8.

3.2 Análisis de la inmunogenicidad de las QVLPs-CD8

Con el fin de determinar la capacidad inmunogénica de las QVLPs-CD8 se realizaron dos ensayos idénticos empleando dos lotes de QVLPs-CD8 producidas y purificadas de forma independiente. Se emplearon 4 grupos (I, II, III y IV) de tres ratones hembra BalbC de ocho semanas de edad. Los grupos fueron formados al azar. La estrategia de inmunización fue similar a la empleada previamente en la caracterización de otros inmunógenos. Esta estrategia se basa en el empleo de una primera dosis (*priming*) de inmunización con el antígeno bajo estudio seguida por una segunda dosis de recuerdo (*booster*), que amplifica la respuesta primaria, con el virus vaccinia recombinante

- VVpJRCS que expresa la proteína CS de malaria. La respuesta inmune inducida se determinó mediante la detección de las células T CD8⁺ específicas de antígeno, en función de su cualidad para producir IFN- γ , mediante un ensayo de ELISPOT (Miyahira Y, Murata K, Rodriguez D, Rodriguez JR, Esteban M, Rodrigues MM, Zavala F. (1995).
- 5 Quantification of antigen specific CD8⁺ T cells using an ELISPOT assay. J Immunol Methods 181: 45-54). En resumen, placas de 96 pocillos con fondos de nitrocelulosa (Millipore) se cubrieron con 75 μ l/pocillo de una solución que contenía 6 μ g/ml del anticuerpo monoclonal de rata anti-IFN- γ murino (R4-6A2, Pharmingen, San Diego, CA) resuspendido en PBS. Las placas fueron incubadas toda la noche a temperatura ambiente.
- 10 Posteriormente, se lavaron los pocillos tres veces con medio RPMI y, finalmente, se incubaron con medio RPMI suplementado con 10% suero fetal de ternera (FCS) durante una hora a 37°C en atmósfera de CO₂ al 5%. Por otro lado, los bazo de los ratones inmunizados, mantenidos en medio RPMI suplementado con 10% de FCS, se dispusieron en una rejilla estéril sobre una placa de 60 mm, y se homogeneizaron, disgregando el
- 15 extracto mediante su paso por agujas de diferente calibre (21G->25G). Las células así disgregadas se centrifugaron 5 min a 1.500 rpm a 4°C, y se lavaron dos veces con medio RPMI + 10% FCS. Para lisar los eritrocitos de las muestras, se añadió NH₄Cl 0,1 M estéril (2 ml/bazo) y se mantuvo a 4°C durante 3-5 min, se añadió RPMI + 10% FCS y se centrifugó. Después, se lavaron 2 veces, y finalmente se resuspendió en 1-2 ml RPMI +
- 20 10% FCS. El recuento de la viabilidad de los esplenocitos se realizó mediante tinción con azul tripan (4% en agua, Sigma).

Las células presentadoras profesionales (APC) utilizadas en este ensayo, fueron las P815. Estas células se ajustaron a una concentración de 10⁶ células/ml y se incubaron con el péptido sintético SYVPSAEQI (correspondiente a la región CD8 de la proteína CS de malaria) 10⁻⁶ M. Tras el tratamiento con el péptido, las células fueron lavadas y tratadas

25 con mitomicina C (30 μ g/ml) (Sigma) durante 15 minutos a 37°C y en atmósfera de CO₂. Después de subsiguientes lavados, las células presentadoras, a las que se adicionó 30 U/ml de interleuquina 2 murina (IL-2), se añadieron a una concentración de 10⁵ células/pocillo. Asimismo, se añadió 100 μ l/pocillo de 10⁶ esplenocitos/ml y diluciones 1/4 y 1/16. Las

30 placas se incubaron durante 18 horas a 37°C en atmósfera de CO₂, se lavaron 5 veces con PBST y se incubaron con 2 μ g/ml del anticuerpo monoclonal de rata biotinilado anti-IFN- γ XMG1.2 (Pharmingen) diluido en PBST, durante 2 horas a temperatura ambiente. Después se lavaron las placas 5 veces con PBST y se añadió una dilución 1/800 de

avidina-peroxidasa (0,5 mg/ml) (Sigma). Tras 1 hora de incubación a temperatura ambiente, se lavó 3 veces con PBST y 2 con PBS, añadiéndose finalmente la mezcla reveladora con 1 µg/ml del sustrato DAB (Sigma), resuspendido en Tris-HCl, pH 7.5, 50 mM, conteniendo 0,015% de H₂O₂. La reacción se detuvo lavando la placa con abundante agua, y una vez seca se llevó a cabo el recuento de las marcas de deposición (spots) con la ayuda de un estereomicroscopio de Leica MZ122 APO y el software Imaging System QWIN (Leica, Cambridge, United kingdom).

Las inmunizaciones fueron realizadas de acuerdo al programa de inmunización descrito en la siguiente tabla:

Grupo	1ª Inmunización. Día 0	2ª Inmunización. Día 14
I	No inmunizado	VVpJRPyCS
II	VVpJRPyCS	VVpJRPyCS
III	VLPs IBDV	VVpJRPyCS
IV	QVLPs-CD8	VVpJRPyCS

Las inmunizaciones con VVpJRCS se realizaron por vía intraperitoneal empleando 10⁷ unidades formadoras de placa (ufp) por animal. Las inmunizaciones con VLPs, tanto VLPs de IBDV no quiméricas como QVLPs-CD8, fueron realizadas por vía intraperitoneal con una dosis de 50 µg de antígeno por animal. En todos los casos las preparaciones antigénicas fueron diluidas en tampón fosfato salino (PBS).

28 días después de la primera inmunización los animales fueron sacrificados y sus bazo empleados para la realización de los ensayos de ELISPOT. Estos ensayos se realizaron siguiendo el protocolo descrito anteriormente. En ambos ensayos se obtuvieron resultados prácticamente idénticos. La Figura 6 muestra los resultados correspondientes al primer ensayo. Los resultados obtenidos demuestran que cuando se emplean QVLPs-CD8 como primera dosis de inmunización seguida por una dosis de recuerdo con el virus VVpJRCS (grupo IV) se produce una potente estimulación de la respuesta inmune celular específica frente al epítipo CD8 de malaria. Esta estimulación es muy superior (20 veces aproximadamente) a la obtenida tras la inmunización con una (grupo I) ó dos dosis de VVpJRCS (grupo II). El hecho de que no se produzca una estimulación significativa de la respuesta frente a E-CD8 en animales inmunizados con VLPs no quiméricas de IBDV (grupo III), respecto al grupo I, que recibió una única dosis de VVpJRCS, demuestra que

la respuesta obtenida en el grupo IV es inducida específicamente por el E-CD8 presente en las proteína de fusión his-CD8-VP3 que forma parte integral de las QVLPs-CD8.

B

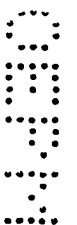
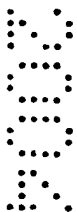
A

B

B

REIVINDICACIONES

1. Una cápsida vacía quimérica del virus causante de la enfermedad de la bursitis infecciosa (IBDV), caracterizada porque está constituida por ensamblaje de (i) proteínas pVP2 de IBDV y (ii) proteínas de fusión que comprenden una región A constituida por la proteína VP3 de IBDV unida a una región B constituida por un polipéptido heterólogo que comprende un polipéptido de interés.
2. Cápsida según la reivindicación 1, en la que dicha región B está unida a la región amino-terminal de la VP3 de IBDV, o, alternativamente, a la región carboxi-terminal de VP3 IBDV.
3. Cápsida según la reivindicación 1, en la que dicho polipéptido de interés es un polipéptido útil en vacunación, terapia o diagnóstico.
4. Cápsida según la reivindicación 1, en la que dicha región B comprende un único polipéptido de interés.
5. Cápsida según la reivindicación 1, en la que dicha región B comprende dos o más polipéptidos de interés.
6. Cápsida según la reivindicación 1, en la que dicha proteína de fusión comprende una región A unida a una única región B.
7. Cápsida según la reivindicación 1, en la que dicha proteína de fusión comprende una región A unida a dos regiones B, iguales o diferentes, una de ellas unida a la región amino-terminal de la VP3 presente en la región A y la otra a la región carboxi-terminal de VP3 presente en la región A.
8. Cápsida según la reivindicación 7, en la que dichas regiones B contienen unos polipéptidos de interés iguales o diferentes entre sí.



9. Cápsida según la reivindicación 1, en la que dicha proteína de fusión comprende, además, un polipéptido espaciador situado entre dichas regiones A y B.

5 10. Un ácido nucleico caracterizado porque su secuencia de nucleótidos comprende la secuencia de nucleótidos que codifica para la proteína de fusión definida en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9.

10 11. Un ácido nucleico caracterizado porque su secuencia de nucleótidos comprende (i) una secuencia de nucleótidos que comprende la fase de lectura abierta correspondiente a la proteína VP3 de IBDV y (ii) una secuencia de nucleótidos que comprende la fase de lectura abierta de uno o más polipéptidos heterólogos que comprenden uno o más polipéptidos de interés.

15 12. Ácido nucleico según la reivindicación 11, que comprende, además, (iii) una secuencia de nucleótidos que comprende la fase de lectura abierta correspondiente a la proteína pVP2 de IBDV.

20 13. Una construcción génica que comprende un ácido nucleico según la reivindicación 10 ú 11.

14. Una construcción génica que comprende un ácido nucleico según la reivindicación 12.

25 15. Un sistema de expresión seleccionado entre:

26 a) un sistema de expresión que comprende una primera construcción génica según la reivindicación 13, operativamente unida a unos elementos de control de transcripción y, opcionalmente, de traducción, y una segunda construcción génica, operativamente unida a unos elementos de control de transcripción y, opcionalmente, de traducción, comprendiendo dicha segunda construcción génica una secuencia de nucleótidos que
30 comprende la fase de lectura abierta correspondiente a la proteína pVP2 de IBDV; y

b) un sistema de expresión que comprende una construcción génica según la reivindicación 14, operativamente unida a unos elementos de control de transcripción y, opcionalmente, de traducción.

16. Sistema de expresión según la reivindicación 15, caracterizado porque dicho sistema se selecciona entre plásmidos, bácmidos, cromosomas artificiales de levadura (YACs), cromosomas artificiales de bacteria (BACs), cromosomas artificiales basados en el bacteriófago P1 (PACs), cósmidos, o virus, que pueden contener, opcionalmente, un origen de replicación heterólogo.

17. Una célula huésped que contiene un ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12, o una construcción génica según cualquiera de las reivindicaciones 13 ó 14, o un sistema de expresión según cualquiera de las reivindicaciones 15 ó 16.

18. Una célula huésped transformada, transfectada o infectada con un sistema de expresión según cualquiera de las reivindicaciones 15 ó 16.

19. Célula huésped según la reivindicación 17 ó 18, caracterizada porque se selecciona entre una célula de mamífero, una célula aviar, una célula de insecto y una levadura.

20. Un procedimiento para la producción de cápsidas vacías quiméricas del virus causante de la enfermedad de la bursitis infecciosa (IBDV) según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, que comprende cultivar una célula huésped según cualquiera de las reivindicaciones 17 a 19, y, si se desea, recuperar dichas cápsidas vacías quiméricas de IBDV.

21. Procedimiento según la reivindicación 20, en el que dicha célula huésped es una célula de insecto, que comprende las etapas de:

- a) preparar un sistema de expresión seleccionado entre (I) y (II), en donde:
 - el sistema de expresión (I) está constituido por un baculovirus recombinante que contiene una construcción génica según la reivindicación 14; y
 - el sistema de expresión (II) está constituido por un primer baculovirus recombinante que contiene una construcción génica que codifica para la

proteína pVP2 de IBDV y por un segundo baculovirus recombinante que contiene una construcción génica según la reivindicación 13;

- 5 b) infectar células de insecto con dicho sistema de expresión preparado en la etapa a);
- c) cultivar las células de insecto infectadas obtenidas en la etapa b) bajo condiciones que permiten la expresión de las proteínas recombinantes y su ensamblaje para formar cápsidas vacías quiméricas de IBDV; y
- d) si se desea, aislar y, opcionalmente, purificar, las cápsidas vacías quiméricas de IBDV.

10

22. Procedimiento según la reivindicación 20, en el que dicha célula huésped es una levadura, que comprende las etapas de:

- 15 a) preparar un sistema de expresión constituido por un plásmido que contiene una construcción génica según la reivindicación 14;
- b) transformar células de levadura con dicho sistema de expresión preparado en la etapa a);
- c) cultivar las levaduras transformadas obtenidas en la etapa b) bajo condiciones que permiten la expresión de las proteínas recombinantes y su ensamblaje para formar cápsidas vacías quiméricas de IBDV; y
- 20 d) si se desea, aislar y, opcionalmente, purificar, las cápsidas vacías quiméricas de IBDV.

23. Empleo de un sistema de expresión génica según cualquiera de las reivindicaciones 15 ó 16, para la producción y obtención de cápsidas vacías quiméricas de IBDV según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9.

24. Empleo de cápsidas vacías quiméricas del virus causante de la enfermedad de la bursitis infecciosa (IBDV) según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en la elaboración de un medicamento.

30

25. Empleo según la reivindicación 24, en el que dicho medicamento es una vacuna.

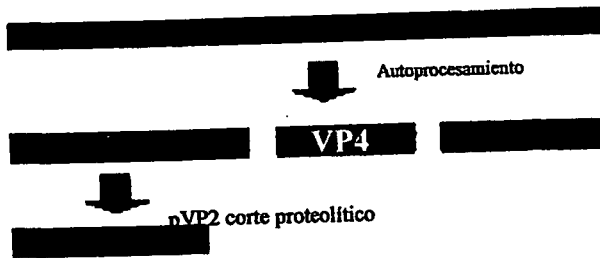
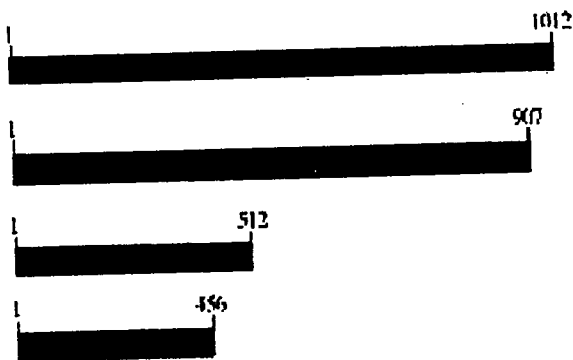
26. Empleo según la reivindicación 24, en el que dicho medicamento es un vector para terapia génica.

5 27. Una vacuna que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de cápsidas vacías quiméricas del virus causante de la enfermedad de la bursitis infecciosa (IBDV) según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, junto con, opcionalmente, uno o más adyuvantes y/o vehículos farmacéuticamente aceptables.

10 28. Vacuna según la reivindicación 27, útil para proteger animales y humanos simultáneamente frente a la infección causada por dos o más agentes infecciosos causantes de enfermedades.

15 29. Un vector para terapia génica que comprende una cápsida vacía quimérica del virus causante de la enfermedad de la bursitis infecciosa (IBDV) según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9.



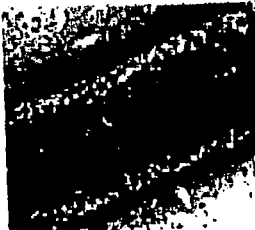
a*b***Construcción Génica****Estructura Resultante**

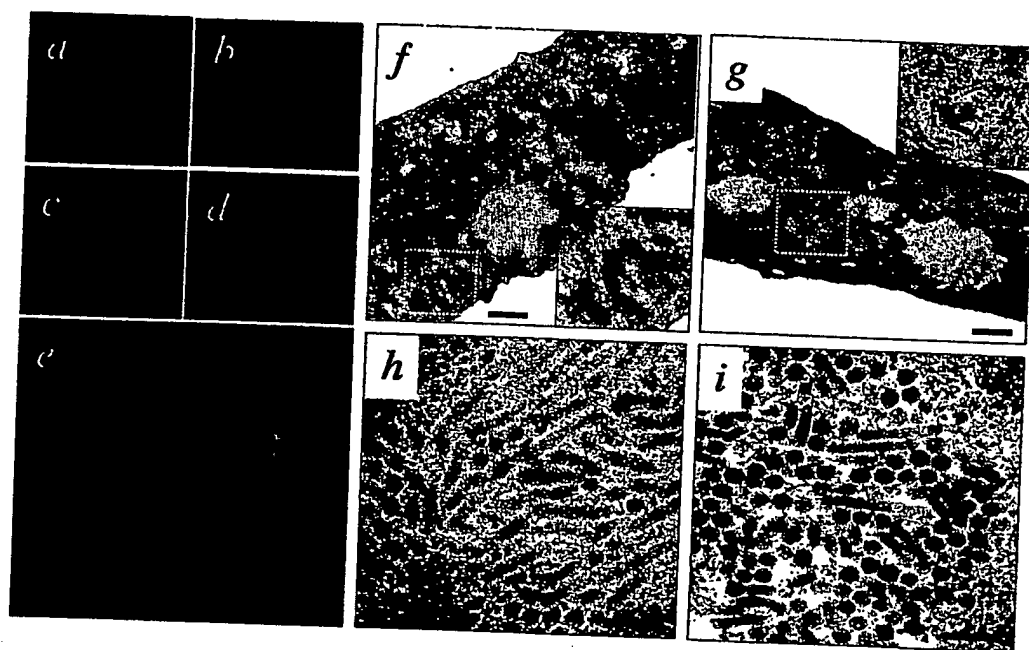
VLP (T=13) y Túbulos de Tipo I*

Túbulos de Tipo I †

Túbulos retorcidos‡

23 nm T=1 Cápsidas

VLP**Túbulos Tipo I****Túbulos Retorcidos****23 nm T=1 Cápsidas****Figura 1**

**Figura 2**

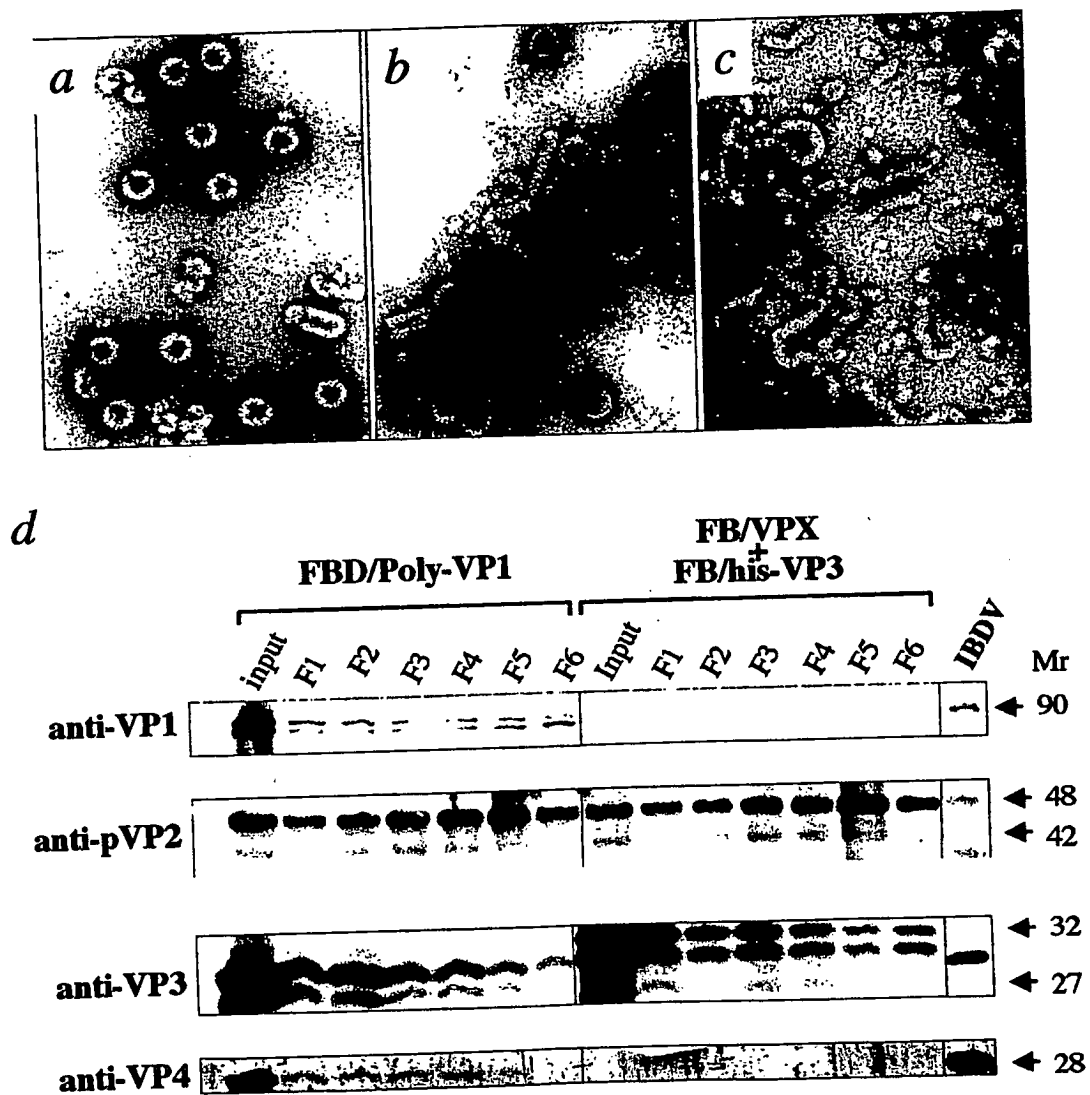
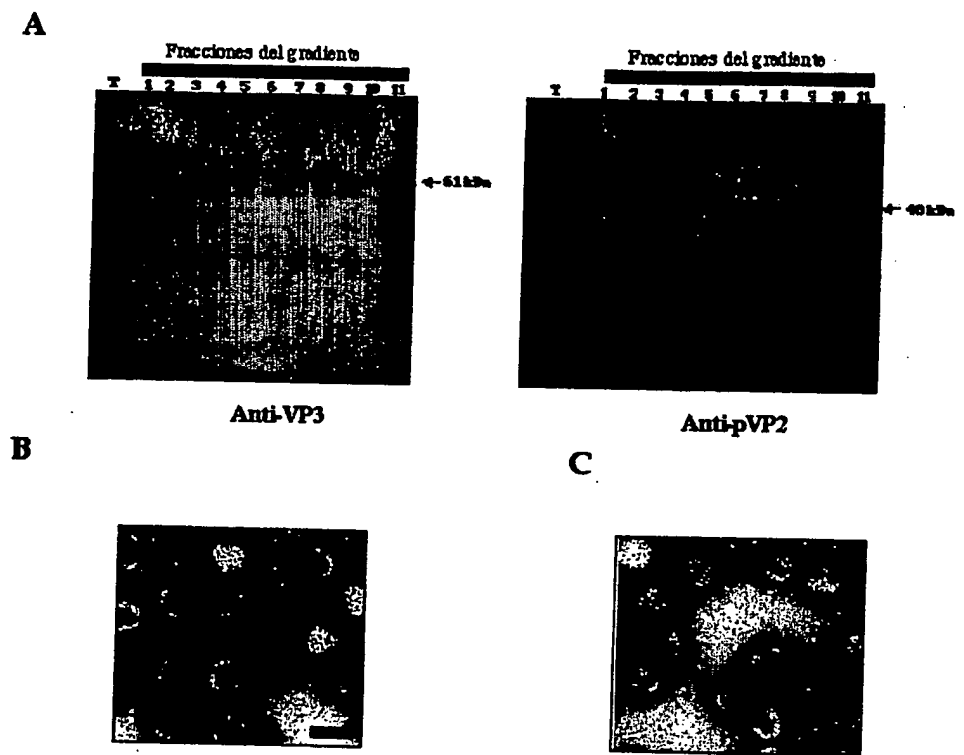
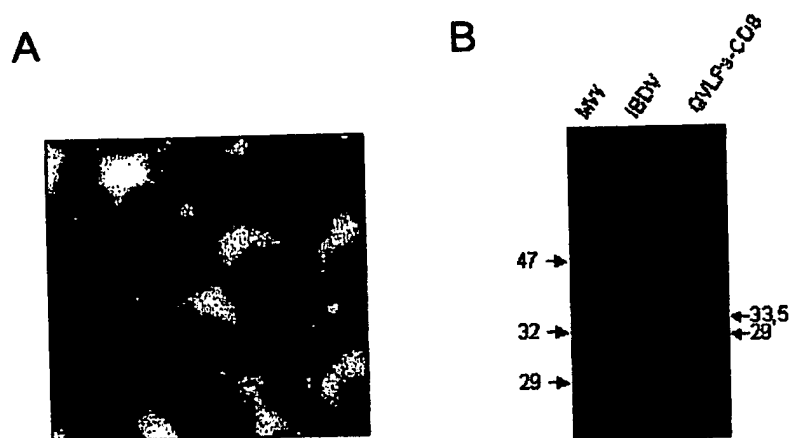


Figura 3

**Figura 4**

12
11
10
9
8
7
6
5
4
3
2
1

**Figura 5**

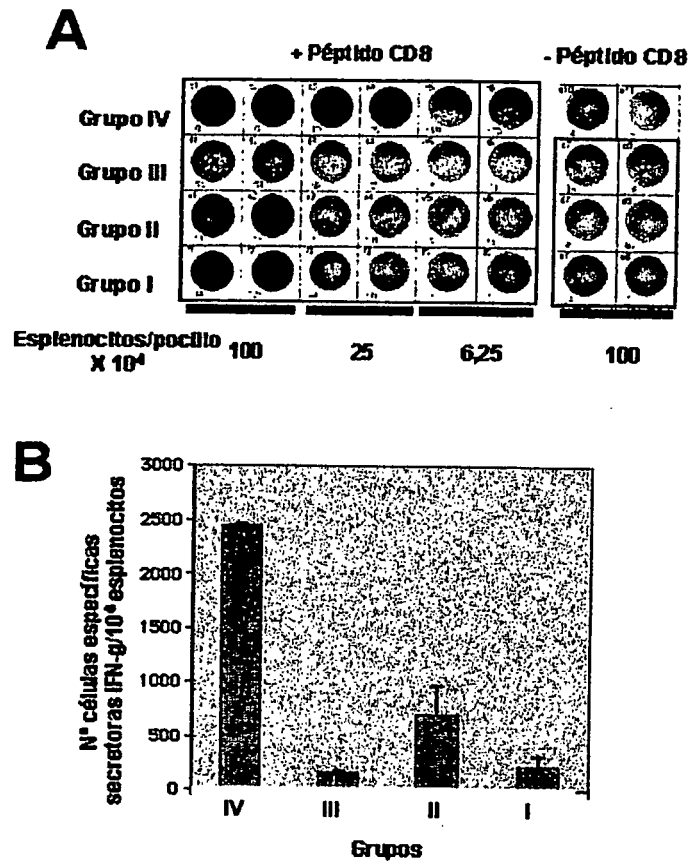


Figura 6

LISTA DE SECUENCIAS

- <110> CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS
- 5 <110> BIONOSTRA, S.L.
- <120> CÁPSIDAS VACÍAS QUIMÉRICAS DEL VIRUS CAUSANTE DE LA ENFERMEDAD DE LA BURSITIS INFECCIOSA (IBDV), SU PROCEDIMIENTO DE OBTENCIÓN Y APLICACIONES
- 10 <130> QVLPs de IBDV
- <160> 14
- 15 <170> PatentIn version 3.1
- <210> 1
- <211> 35
- 20 <212> DNA
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> Oligo I
- 25 <400> 1
- gcgcgatct atgacaaacc tgtcagatca aaccc 35
- 30 <210> 2
- <211> 34
- <212> DNA
- <213> Secuencia artificial
- 35 <220>
- <223> Oligo II
- <400> 2
- gcgcaagctt aggcgagagt cagctgcctt atgc 34
- 40 <210> 3
- <211> 7595
- <212> DNA
- 45 <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> Plásmido pFBD/pVP2-his-VP3
- 50 <220>
- <221> promotor
- <222> (157) .. (285)
- <223> Promotor ppolh
- 55 <220>
- <221> CDS
- <222> (291) .. (1289)
- <223> pVP2 ORF

<220>
 <221> promotor
 <222> (7443)..(7503)
 <223> Promotor p10

5

<400> 3
 ggggtgatcaa gtcttcgctcg agtgattgta aataaaatgt aatttacagt atagtatttt 60
 aattaatata caaatgattt gataataatt cttattttaac tataatatat tgtgttgagg 120
 tgaattaaag gtccgtatac tccggaatat taatagatca tggagataat taaaatgata 180
 accatctcgc aaataaataa gtatttttact gttttcgtaa cagtttttgta ataaaaaac 240
 ctataaatat tccggattat tcataccgtc ccaccatcgg gcgcggatct atg aca 296
 Met Thr
 1

20

aac ctg tca gat caa acc cag cag att gtt ccg ttc ata cgg agc ctt 344
 Asn Leu Ser Asp Gln Thr Gln Gln Ile Val Pro Phe Ile Arg Ser Leu
 5 10 15

25

ctg atg cca aca acc gga ccg gcg tcc att ccg gac gac acc ctg gag 392
 Leu Met Pro Thr Thr Gly Pro Ala Ser Ile Pro Asp Asp Thr Leu Glu
 20 25 30

30

aag cac act ctc agg tca gag acc tcg acc tac aat ttg act gtg ggg 440
 Lys His Thr Leu Arg Ser Glu Thr Ser Thr Tyr Asn Leu Thr Val Gly
 35 40 45 50

35

gac aca ggg tca ggg cta att gtc ttt ttc cct gga ttc cct ggc tca 488
 Asp Thr Gly Ser Gly Leu Ile Val Phe Phe Pro Gly Phe Pro Gly Ser
 55 60 65

40

att gtg ggt gct cac tac aca ctg cag ggc aat ggg aac tac aag ttc 536
 Ile Val Gly Ala His Tyr Thr Leu Gln Gly Asn Gly Asn Tyr Lys Phe
 70 75 80

45

gat cag atg ctc ctg act gcc cag aac cta ccg gcc agt tac aac tac 584
 Asp Gln Met Leu Leu Thr Ala Gln Asn Leu Pro Ala Ser Tyr Asn Tyr
 85 90 95

50

tgc agg cta gtg agt ccg agt ctc aca gtg agg tca agc aca ctt cct 632
 Cys Arg Leu Val Ser Arg Ser Leu Thr Val Arg Ser Ser Thr Leu Pro
 100 105 110

55

ggt ggc gtt tat gca cta aac ggc acc ata aac gcc gtg acc ttc caa 680
 Gly Gly Val Tyr Ala Leu Asn Gly Thr Ile Asn Ala Val Thr Phe Gln
 115 120 125 130

60

gga agc ctg agt gaa ctg aca gat gtt agc tac aat ggg ttg atg tct 728
 Gly Ser Leu Ser Glu Leu Thr Asp Val Ser Tyr Asn Gly Leu Met Ser
 135 140 145

65

gca aca gcc aac atc aac gac aaa att ggg aac gtc cta gta ggg gaa 776
 Ala Thr Ala Asn Ile Asn Asp Lys Ile Gly Asn Val Leu Val Gly Glu
 150 155 160

	ggg gtc acc gtc ctc agc tta ccc aca tca tat gat ctt ggg tat gtg	824
	Gly Val Thr Val Leu Ser Leu Pro Thr Ser Tyr Asp Leu Gly Tyr Val	
	165 170 175	
5	agg ctt ggt gac ccc att ccc gca ata ggg ctt gac cca aaa atg gta	872
	Arg Leu Gly Asp Pro Ile Pro Ala Ile Gly Leu Asp Pro Lys Met Val	
	180 185 190	
10	gcc aca tgt gac agc agt gac agg ccc aga gtc tac acc ata act gca	920
	Ala Thr Cys Asp Ser Ser Asp Arg Pro Arg Val Tyr Thr Ile Thr Ala	
	195 200 205 210	
15	gcc gat gat tac caa ttc tca tca cag tac caa cca ggt ggg gta aca	968
	Ala Asp Asp Tyr Gln Phe Ser Ser Gln Tyr Gln Pro Gly Gly Val Thr	
	215 220 225	
20	atc aca ctg ttc tca gcc aac att gat gcc atc aca agc ctc agc gtt	1016
	Ile Thr Leu Phe Ser Ala Asn Ile Asp Ala Ile Thr Ser Leu Ser Val	
	230 235 240	
	ggg gga gag ctc gtg ttt cga aca agc gtc cac ggc ctt gta ctg ggc	1064
	Gly Gly Glu Leu Val Phe Arg Thr Ser Val His Gly Leu Val Leu Gly	
	245 250 255	
25	gcc acc atc tac ctc ata ggc ttt gat ggg aca acg gta atc acc agg	1112
	Ala Thr Ile Tyr Leu Ile Gly Phe Asp Gly Thr Thr Val Ile Thr Arg	
	260 265 270	
30	gct gtg gcc gca aac aat ggg ctg acg acc ggc acc gac aac ctt atg	1160
	Ala Val Ala Ala Asn Asn Gly Leu Thr Thr Gly Thr Asp Asn Leu Met	
	275 280 285 290	
35	cca ttc aat ctt gtg att cca aca aac gag ata acc cag cca atc aca	1208
	Pro Phe Asn Leu Val Ile Pro Thr Asn Glu Ile Thr Gln Pro Ile Thr	
	295 300 305	
40	tcc atc aaa ctg gag ata gtg acc tcc aaa agt ggt ggt cag gca ggg	1256
	Ser Ile Lys Leu Glu Ile Val Thr Ser Ser Lys Ser Gly Gly Gln Ala Gly	
	310 315 320	
	gat cag atg tca tgg tgg gca aga ggg agc cta gcagtgcga tccatgggtgg	1309
	Asp Gln Met Ser Trp Ser Ala Arg Gly Ser Leu	
	325 330	
45	caactatcca ggggccctcc gtcccgctcac gctagtggcc tacgaaagag tggcaacagg	1369
	atccgctcggt acggctcgctg ggggtgagcaa ctctgagctg atcccaaata ctgaactagc	1429
	aaagaacctg gttacagaat acggccgatt tgaccagga gccatgaact acacaaaatt	1489
50	gatactgagt gagagggacc gtcttggcat caagaccgtc tggccaacaa gggagtacac	1549
	tgactttcgt gaatacttca tggaggtggc cgacctcaac tctcccctga agattgcagg	1609
55	agcattcggc ttcaaagaca taatccgggc cataaggagg atagctgtgc cgggtggtctc	1669
	cacattgttc ccacctgccg ctcccctagc ccatgcaatt ggggaagggtg tagactacct	1729
	gctgggcgat gaggcccagg ccgcttcagg aactgctcga gccgcgtcag gaaaagcaag	1789
60		

agctgcctca ggccgcataa ggcagctgac tctgcctaa gcttgctgag aagtactaga 1849
 ggatcataat cagccatacc acattttagtag aggttttact tgctttaaaa aacctccac 1909
 5 acctccccct gaacctgaaa cataaaatga atgcaattgt tgttggttaac ttgtttattg 1969
 cagcttataa tggttacaaa taaagcaata gcatcacaaa tttcacaaat aaagcatttt 2029
 10 tttcactgca ttctagttgt ggtttgcca aactcatcaa tgtatcttat catgtctgga 2089
 tctgatcact gcttgagcct aggagatccg aaccagataa gtgaaatcta gttccaaact 2149
 attttgtcat ttttaatttt cgtattagct tacgacgcta caccagttc ccatctattt 2209
 15 tgtcactctt ccctaaataa tccttaaaaa ctccatttcc acccctccca gttcccaact 2269
 attttgtccg cccacagcgg ggcatttttc ttctgttat gtttttaate aaacatcttg 2329
 ccaactccat gtgacaaacc gtcactctcg gctacttttt ctctgtcaca gaatgaaaat 2389
 20 ttttctgtca tctcttcgtt attaattgtt gtaattgact gaatatcaac gcttatttgc 2449
 agcctgaatg gcgaatggga cgcgccctgt agcggcgcat taagcgcggc ggggtgtggtg 2509
 25 gttacgcgca gcgtgaccgc tacacttgcc agcgccctag cgcccgctcc ttctgcttcc 2569
 ttcccttctt ttctcgccac gttcgccggc tttccccgtc aagctctaaa tcggggggctc 2629
 cctttagggg tccgatttag tgctttacgg cacctcgacc ccaaaaaact tgattagggg 2689
 30 gatggttcac gtagtggggc atcgccctga tagacggttt ttcgcccttt gacgttgagg 2749
 tccacgttct ttaatagtgg actcttggtc caaactggaa caaactcaa cctatctcg 2809
 35 gtctattctt ttgatttata agggattttg ccgatttcgg cctattgggt aaaaaatgag 2869
 ctgatttaac aaaaatttaa cgcgaatttt aacaaaatat taacgtttac aatttcaggt 2929
 ggcacttttc ggggaaatgt gcgcggaacc cctatttggt tatttttcta aatacattca 2989
 40 aatatgtatc cgctcatgag acaataacce tgataaatgc ttcaataata ttgaaaaagg 3049
 aagagtatga gtattcaaca tttcgtgtc gcccttatcc ctttttttgc ggcattttgc 3109
 45 cttcctgttt ttgctcacc agaaacgctg gtgaaagtaa aagatgctga agatcagttg 3169
 ggtgcacgag tgggttacat cgaactggat ctcaacagcg gtaagatcct tgagagtttt 3229
 50 cgccccgaag aacgttttcc aatgatgagc acttttaaag ttctgctatg tggcgcggta 3289
 ttatcccgtt ttgacgccgg gcaagagcaa ctcggtcgcc gcatacacta ttctcagaat 3349
 gacttggttg agtactcacc agtcacagaa aagcatctta cggatggcat gacagtaaga 3409
 55 gaattatgca gtgctgcat aaccatgagt gataaactg cggccaactt acttctgaca 3469
 acgatcggag gaccgaagga gctaaccgtt tttttgcaca acatggggga tcatgtaact 3529
 60 cgccttgatc gttgggaacc ggagctgaat gaagccatac caaacgacga gcgtgacacc 3589

acgatgcctg tagcaatggc aacaacgttg cgcaaactat taactggcga actacttact 3649
 ctagcttccc ggcaacaatt aatagactgg atggaggcgg ataaagttgc aggaccactt 3709
 5 ctgcgctcgg cccttcgggc tggctggttt attgctgata aatctggagc cggtagagct 3769
 ggggtctcgg gtatcattgc agcactgggg ccagatggta agccctcccg tatcgtagtt 3829
 atctacacga cggggagtca ggcaactatg gatgaacgaa atagacagat cgctgagata 3889
 10 ggtgcctcac tgattaagca ttggttaactg tcagaccaag tttactcata tatacttttag 3949
 attgatttaa aacttcattt ttaatttaaa aggatctagg tgaagatcct ttttgataat 4009
 15 ctcatgacca aaatccctta acgtgagttt tcgttccact gagcgtcaga ccccgtagaa 4069
 aagatcaaag gatcttcttg agatcctttt tttctgcgcg taatctgctg cttgcaaaca 4129
 aaaaaaccac cgctaccagc ggtggtttgt ttgccggatc aagagctacc aactcttttt 4189
 20 ccgaaggtaa ctggcttcag cagagcgcag ataccaaata ctgtccttct agttagccg 4249
 tagttaggcc accacttcaa gaactctgta gcaccgcta catacctcgc tctgctaate 4309
 25 ctgttaccag tggctgctgc cagtggcgat aagtcgtgtc ttaccgggtt ggactcaaga 4369
 cgatagttac cggataaggc gcagcggtcg ggtgaacgg ggggttcgtg cacacagccc 4429
 agcttggagc gaacgaccta caccgaactg agatacctac agcgtgagca ttgagaaagc 4489
 30 gccacgcttc ccgaaggag aaaggcggac aggtatccgg taagcggcag ggtcggaaca 4549
 ggagagcgca cgagggagct tccaggggga aacgcctggt atctttatag tctgtcggg 4609
 35 tttcgccacc tctgacttga gcgtcgattt ttgtgatgct cgtcaggggg gcggagccta 4669
 tggaaaaacg ccagcaacgc ggccttttta cggttcctgg ccttttgctg gccttttgct 4729
 cacatgttct ttcctgcgtt atcccctgat tctgtggata accgtattac cgcctttgag 4789
 40 tgagctgata ccgctcgccg cagccgaacg accgagcgca gcgagtcagt gagcgaggaa 4849
 gcggaagagc gcctgatgcg gtattttctc cttacgcata tgtgcggtat ttacaccgc 4909
 45 agaccagccg cgtaacctgg caaaatcggt tacggttgag taataaatgg atgccttgcg 4969
 taagcgggtg tgggcggaca ataaagtctt aaactgaaca aatagatct aaactatgac 5029
 aataaagtct taaactagac agaatagttg taaactgaaa tcagtccagt tatgctgtga 5089
 50 aaaagcatat tggacttttg ttatggctaa agcaaactct tcattttctg aagtgcaa 5149
 tgcccgtcgt attaaagagg ggcgtggcca agggcatggt aaagactata ttcgcggcgt 5209
 55 tgtgacaatt taccgaacaa ctccgcggcc gggaagccga tctcggttg aacgaattgt 5269
 taggtggcgg tacttgggtc gatatcaaag tgcatactt cttcccgat gcccaacttt 5329
 gtatagagag ccactgcggg atcgtcaccg taatctgctt gcacgtagat cacataagca 5389
 60

ccaagcgcgt tggcctcatg cttgaggaga ttgatgagcg cggaggcaat gccctgcctc 5449
 cgggtgctcgc cggagactgc gagatcatag atatagatct cactacgcgg ctgctcaaac 5509
 5 ctgggcagaa cgtaagccgc gagagcgcca acaaccgctt cttggtcgaa ggcagcaagc 5569
 gcgatgaatg tcttactacg gagcaagttc ccgaggtaat cggagtccgg ctgatgttgg 5629
 10 gagtaggtgg ctacgtctcc gaactcacga ccgaaaagat caagagcagc ccgcatggat 5689
 ttgacttggg cagggccgag cctacatgtg cgaatgatgc ccatacttga gccacctaac 5749
 tttgttttag ggcgactgcc ctgctgcgta acatcggttg tgctgcgtaa catcggttgc 5809
 15 gctccataac atcaaaccatc gacccacggc gtaacgcgct tgctgcttgg atgcccagg 5869
 catagactgt acaaaaaaac agtcataaca agccatgaaa accgccactg cgccgttacc 5929
 accgctgcgt tcggtcaagg ttctggacca gttgcgtgag cgcatacgtt acttgcat 5989
 20 cagtttacga accgaacagg cttatgtcaa ctgggttcgt gccttcatcc gtttccacgg 6049
 tgtgcgtcac ccggcaacct tgggcagcag cgaagtcgag gcatttctgt cctggctggc 6109
 25 gaacgagcgc aagggttcgg tctccacgca tcgtcaggca ttggcggcct tgctgttctt 6169
 ctacggcaag gtgctgtgca cggatctgcc ctggcttcag gagatcggtg gacctcggcc 6229
 gtcgcggcgc ttgccggtgg tgctgacccc ggatgaagtg gttgcgcatcc tcggttttct 6289
 30 ggaaggcgag catcgtttgt tcgcccagga ctctagctat agttctagtg gttggcctac 6349
 gtacccgtag tggctatggc agggcttgcc gcccgcgct tggctgcgag ccctgggcct 6409
 35 tcacccgaac ttgggggttg ggggtgggaa aaggaagaaa cgcgggcgta ttgggtccaa 6469
 tgggggtctcg gtgggggtatc gacagagtgc cagccctggg accgaacccc gcgtttatga 6529
 acaaacgacc caacacccgt gcgttttatt ctgtcttttt attgccgtca tagcgcgggt 6589
 40 tccttcgggt attgtctcct tccgtgtttc agttagctc cccatctcc cggtagcgca 6649
 tgccctgaga ctgcaggctc tagattcgaa agcggccgcg actagtgagc tcgtcgacgt 6709
 45 aggcctttga attccggatc ctcaactcaag gtcctcatca gagacgggtc tgatccagcg 6769
 gccagccga ccagggggtc tctgtgttgg agcattgggt tttggcttgg gctttggtag 6829
 agcccgcctg ggattgcgat gcttcatctc catcgagtc aagagcagat ctttcatctg 6889
 50 ttcttggttt gggccacgtc catggttgat ttcatagact ttggcaactt cgtctatgaa 6949
 agcttggggg ggctctgctt gtcctggagc cccgtagatc gacgtagctg cccttaggat 7009
 55 ttgttcttct gatgccaacc ggctcttctc tgcatgcacg tagtctagat agtcctcggt 7069
 tgggtccggg atttctcggt tggtctgcca gtactttacc tggcctgggc ttggccctcg 7129
 60 gtgcccattg agtgctaccc attctggtgt tgcaaagtag atgcccattg tctccatctt 7189

ctttgagatc cgtgtgtctt tttccctctg tgcttctctt ggtgtggggc cccgagcctc 7249
 cactccgtag cctgctgtcc cgtacttggc cctttgcgac ttgctgcctg cttgtgggtgc 7309
 5 gtttgaaga aaatttcgca tccgatgggc gttcgggtcg ctgagtgcga agttggccat 7369
 gtcagtcaca atcccattct cttccagcca catgaacaca ctgagtgcag attggaatag 7429
 10 tgggtccacg ttggtgctg cttccattgc tctgacggca ctctcgagtt cgggggtctc 7489
 tttgaactct gatgcagcca tggcgccctg aaaatacagg ttttcggtcg ttgggatatc 7549
 gtaatcgtga tggatgatgt gatggtagta cgacatgggt tcggac 7595

15

<210> 4
 <211> 333
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20

<220>
 <223> Plásmido pFBD/pVP2-his-VP3

25

<400> 4
 Met Thr Asn Leu Ser Asp Gln Thr Gln Gln Ile Val Pro Phe Ile Arg
 1 5 10 15

Ser Leu Leu Met Pro Thr Thr Gly Pro Ala Ser Ile Pro Asp Asp Thr
 20 25 30

30

Leu Glu Lys His Thr Leu Arg Ser Glu Thr Ser Thr Tyr Asn Leu Thr
 35 40 45

35

Val Gly Asp Thr Gly Ser Gly Leu Ile Val Phe Phe Pro Gly Phe Pro
 50 55 60

Gly Ser Ile Val Gly Ala His Tyr Thr Leu Gln Gly Asn Gly Asn Tyr
 65 70 75 80

40

Lys Phe Asp Gln Met Leu Leu Thr Ala Gln Asn Leu Pro Ala Ser Tyr
 85 90 95

Asn Tyr Cys Arg Leu Val Ser Arg Ser Leu Thr Val Arg Ser Ser Thr
 100 105 110

45

Leu Pro Gly Gly Val Tyr Ala Leu Asn Gly Thr Ile Asn Ala Val Thr
 115 120 125

50

Phe Gln Gly Ser Leu Ser Glu Leu Thr Asp Val Ser Tyr Asn Gly Leu
 130 135 140

Met Ser Ala Thr Ala Asn Ile Asn Asp Lys Ile Gly Asn Val Leu Val
 145 150 155 160

55

Gly Glu Gly Val Thr Val Leu Ser Leu Pro Thr Ser Tyr Asp Leu Gly
 165 170 175

Tyr Val Arg Leu Gly Asp Pro Ile Pro Ala Ile Gly Leu Asp Pro Lys
 180 185 190

60

Met Val Ala Thr Cys Asp Ser Ser Asp Arg Pro Arg Val Tyr Thr Ile
 195 200 205

5 Thr Ala Ala Asp Asp Tyr Gln Phe Ser Ser Gln Tyr Gln Pro Gly Gly
 210 215 220

Val Thr Ile Thr Leu Phe Ser Ala Asn Ile Asp Ala Ile Thr Ser Leu
 225 230 235 240

10 Ser Val Gly Gly Glu Leu Val Phe Arg Thr Ser Val His Gly Leu Val
 245 250 255

15 Leu Gly Ala Thr Ile Tyr Leu Ile Gly Phe Asp Gly Thr Thr Val Ile
 260 265 270

Thr Arg Ala Val Ala Ala Asn Asn Gly Leu Thr Thr Gly Thr Asp Asn
 275 280 285

20 Leu Met Pro Phe Asn Leu Val Ile Pro Thr Asn Glu Ile Thr Gln Pro
 290 295 300

Ile Thr Ser Ile Lys Leu Glu Ile Val Thr Ser Lys Ser Gly Gly Gln
 305 310 315 320

25 Ala Gly Asp Gln Met Ser Trp Ser Ala Arg Gly Ser Leu
 325 330

30 <210> 5
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> Oligo III

<400> 5
 gcgcagatct atgacaaacc tgtcagatca aaccc

40

<210> 6
 <211> 34
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Oligo IV

50 <400> 6
 gcgcaagctt aggcgagagt cagctgcctt atgc

55 <210> 7
 <211> 9600
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

60 <220>
 <223> Plásmido pESCURA/pVP2-VP3-GFP

35

34

<220>
 <221> promotor
 <222> (5649)..(5859)
 5 <223> Promotor 1 (pVP2)

<220>
 <221> promotor
 10 <222> (7402)..(8080)
 <223> Promotor 2 (VP3-GFP)

<220>
 <221> CDS
 15 <222> (8086)..(9597)
 <223> VP3-GFP ORF

<400> 7
 20 ggccgcacta gtatcgatgg attacaagga tgacgacgat aagatctgag ctcttaatta 60
 acaattcttc gccagagggt tggtaagtc tccaatcaag gttgtcggct tgtctacctt 120
 gccagaaatt tacgaaaaga tggaaaaggg tcaaatcggt ggtagatacg ttgttgacac 180
 25 ttctaaataa gcgaatttct tatgatttat gatttttatt attaaataag ttataaaaaa 240
 aataagtgtg taaaaatttt aaagtgactc ttaggtttta aaacgaaaat tcttattctt 300
 30 gagtaactct ttctgtagg tcaggttgct ttctcaggta tagcatgagg tcgctccaat 360
 tcagctgcat taatgaatcg gccaacgcgc ggggagaggc ggtttgcgta ttgggcgctc 420
 ttccgcttcc tcgctcactg actcgctgcg ctcggtcggt cggctgcggc gagcgggtatc 480
 35 agctcactca aaggcggtaa tacggttata cacagaatca ggggataacg caggaaagaa 540
 catgtgagca aaaggccagc aaaaggccag gaaccgtaaa aaggccgcgt tgctggcggt 600
 40 tttccatagg ctccgcccc ctgacgagca tcacaaaaat cgacgctcaa gtcagagggtg 660
 gcgaaacccg acaggactat aaagatacca ggcgtttccc cctggaagct ccctcgctgcg 720
 ctctcctggt ccgaccctgc cgcttaccgg atacctgtcc gcctttctcc ctccgggaag 780
 45 cgtggcgctt tctcatagct cacgctgtag gtatctcagt tcgggtgtag tcgttcgctc 840
 caagctgggc tgtgtgcacg aacccccgt tcagcccgac cgctgcgcct tatccggtaa 900
 50 ctatcgtctt gagtccaacc cggtaagaca cgacttatcg cactggcag cagccactgg 960
 taacaggatt agcagagcga ggtatgtagg cgggtgtaca gagttcttga agtgggtggc 1020
 taactacggc tacactagaa ggacagtatt tggatatctgc gctctgctga agccagttac 1080
 55 ctccggaaaa agagttggta gctcttgatc cggcaaaaa accaccgctg gtagcgggtg 1140
 tttttttggt tgcaagcagc agattacgcg cagaaaaaaaa ggatctcaag aagatccttt 1200
 60 gatcttttct acggggtctg acgctcagtg gaacgaaaac tcacgttaag ggattttggt 1260

catgagatta tcaaaaagga ttttcaccta gatcctttta aattaaaaat gaagtttttaa 1320
 5 atcaatctaa agtatatatg agtaaacttg gtctgacagt taccaatgct taatcagtga 1380
 ggcacctatc tcagcgatct gtctatttcg ttcattccata gttgcctgac tccccgctgt 1440
 gtagataact acgatacggg agggcttacc atctggcccc agtgetgcaa tgataccgcg 1500
 10 agaccacgc tcaccggctc cagatttacc agcaataaac cagccagccg gaagggccga 1560
 gcgcagaagt ggtcctgcaa ctttatccgc ctccatccag tctattaatt gttgccggga 1620
 agctagagta agtagttcgc cagttaatag tttgcgcaac gttgttgcca ttgctacagg 1680
 15 catcgtggtg tcacgctcgt cgtttggtat ggcttcattc agctccggtt cccaacgata 1740
 aaggcgagtt acatgatccc ccatgttggtg caaaaaagcg gttagctcct tcggctcctc 1800
 20 gatcgttgct agaagtaagt tggccgcagt gttatcactc atggttatgg cagcactgca 1860
 taattctctt actgtcatgc catccgtaag atgcttttct gtgactgggtg agtactcaac 1920
 caagtcattc tgagaatagt gtatgcggcg accgagttgc tcttgccccg cgtcaatacg 1980
 25 ggataatacc gcgccacata gcagaacttt aaaagtgtc atcattggaa aacgttcttc 2040
 ggggcgaaaa ctctcaagga tcttaccgct gttgagatcc agttcgatgt aaccactcgt 2100
 30 tgcacccaac tgatcttcag catcttttac tttaccagc gtttctgggt gagcaaaaac 2160
 aggaaggcaa aatgccgcaa aaaagggaat aagggcgaca cggaaatgtt gaatactcat 2220
 actcttcctt tttcaatatt attgaagcat ttatcagggt tattgtctca tgagcggata 2280
 35 catatttgaa tgtattttaga aaaataaaca aataggggtt ccgcgcacat tccccgaaa 2340
 agtgccacct gaacgaagca tctgtgcttc atttttaga acaaaaatgc aacgcgagag 2400
 40 cgctaatttt tcaaacaag aatctgagct gcatttttac agaacagaaa tgcaacgcga 2460
 aagcgctatt ttaccaacga agaattctgtg cttcattttt gtaaaacaaa aatgcaacgc 2520
 gagagcgcta atttttcaaa caaagaatct gagctgcatt ttacagAAC agaaatgcaa 2580
 45 cgcgagagcg ctattttacc aacaaagaat ctatacttct tttttgttct acaaaaatgc 2640
 atcccagagag cgctattttt ctaacaaagc atcttagatt actttttttc tcttttgtgc 2700
 50 gctctataat gcagtctctt gataactttt tgcactgtag gtccgttaag gttagaagaa 2760
 ggctactttg gtgtctatct tctcttccat aaaaaagcc tgactccact tcccgcgttt 2820
 actgattact agcgaagctg cgggtgcatt ttttcaagat aaaggcatcc ccgattatat 2880
 55 tctataccga tgtggattgc gcatactttg tgaacagaaa gtgatagcgt tgatgattct 2940
 tcattgggtca gaaaattatg aacggtttct tctattttgt ctctatatac tacgtatagg 3000
 60 aaatgtttac attttcgtat tgttttcgat tcactctatg aatagttctt actacaattt 3060

ttttgtctaa agagtaatac tagagataaa cataaaaaat gtagagggtcg agtttagatg 3120
 5 caagttcaag gagcgaaagg tggatgggta gggtatatag ggatatagca cagagatata 3180
 tagcaaagag atacttttga gcaatgtttg tggaagcggg attcgcaata ttttagtagc 3240
 tcgttacagt ccggtgcgtt tttgggtttt tgaaagtgcg tcttcagagc gcttttggtt 3300
 10 ttcaaaagcg ctctgaagtt cctatacttt ctagagaata ggaacttcgg aataggaact 3360
 tcaaagcgtt tccgaaaacg agcgttccg aaaatgcaac gcgagctgcg cacatacagc 3420
 15 tcaactgttca cgtcgcacct atatctgcgt gttgcctgta tatatatata catgagaaga 3480
 acggcatagt gcgtgtttat gcttaaagtc gtacttatat gcgtctatct atgtaggatg 3540
 aaaggtagtc tagtacctcc tgtgatatta tcccattcca tgcgggggtat cgtatgcttc 3600
 20 cttcagcact acccttttagc tgttctatat gctgccactc ctcaattgga ttagtctcat 3660
 ccttcaatgc tatcatttcc tttgatattg gatcatacta agaaaccatt attatcatga 3720
 25 cattaaccta taaaaatagg cgtatcacga ggccctttcg tctcgcgcgt ttcggtgatg 3780
 acggtgaaaa cctctgacac atgcagctcc cggagacggg cacagcttgt ctgtaagcgg 3840
 atgccggggag cagacaagcc cgtcagggcg cgtcagcggg tgttggcggg tgtcggggct 3900
 30 ggcttaacta tgcggcatca gagcagattg tactgagagt gcaccatacc acagcttttc 3960
 aattcaattc atcatttttt ttttattctt ttttttgatt tcggtttctt tgaaattttt 4020
 35 ttgattcggg aatctccgaa cagaaggaag aacgaaggaa ggagcacaga cttagattgg 4080
 tatatatacg catatgtagt gttgaagaaa catgaaattg ccagtatctt ttaacccaac 4140
 tgcacagaac aaaaacctgc aggaacgaa gataaatcat gtcgaaagct acatataagg 4200
 40 aacgtgctgc tactcatcct agtcctgttg ctgccaaagct atttaatatc atgcacgaaa 4260
 agcaaacaaa cttgtgtgct tcattggatg ttcgtaccac caaggaatta ctggagttag 4320
 45 ttgaagcatt aggtcccaaa atttgtttac taaaaacaca tgtggatatt ttgactgatt 4380
 tttccatgga gggcacagtt aagccgctaa aggcattatc cgccaagtac aattttttac 4440
 tcttcgaaga cagaaaattt gctgacattg gtaatacagt caaattgcag tactctgcgg 4500
 50 gtgtatacag aatagcagaa tgggcagaca ttacgaatgc acacgggtgtg gtgggcccag 4560
 gtattgttag cggtttgaag caggcggcag aagaagtaac aaaggaacct agaggccttt 4620
 55 tgatgttagc agaattgtca tgcaagggct ccctatctac tggagaatat actaagggtg 4680
 ctgttgacat tgcgaagagc gacaaagatt ttgttatcgg ctttattgct caaagagaca 4740
 tgggtggaag agatgaaggt tacgattggg tgattatgac acccgggtgtg ggtttagatg 4800
 60 acaagggaga cgcattgggt caacagtata gaaccgtgga tgatgtgggc tctacaggat 4860

ctgacattat tattgttgga agaggactat ttgcaaaggg aagggatgct aaggtagagg 4920
 5 gtgaacgtta cagaaaagca ggctgggaag catatttgag aagatgcggc cagcaaaact 4980
 aaaaaactgt attataagta aatgcatgta tactaaactc acaaattaga gcttcaattt 5040
 aattatatca gttattaccc tatgcggtgt gaaataccgc acagatgcgt aaggagaaaa 5100
 10 taccgcatca ggaaattgta aacgttaata ttttggtaaa attcgcgtta aatttttgtt 5160
 aaatcagctc attttttaac caataggccg aaatcggcaa aatcccttat aaatcaaaag 5220
 15 aatagaccga gataggggtg agtggtgttc cagtttgga caagagtcca ctattaaaga 5280
 acgtggactc caacgtcaaa gggcgaaaaa ccgtctatca gggcgatggc ccactacgtg 5340
 aaccatcacc ctaatcaagt tttttgggtt cgaggtgccg taaagcacta aatcggaacc 5400
 20 ctaaagggag ccccgattt agagcttgac ggggaaagcc ggcgaaactg gcgagaaagg 5460
 aaggggaagaa agcgaaagga gcgggcgcta gggcgctggc aagtgtagcg gtcacgctgc 5520
 25 gcgtaaccac cacaccgcc gcgcttaatg cgccgctaca gggcgctcg cgccattcgc 5580
 cattcaggct gcgcaactgt tgggaagggc gatcgggtcg ggcctcttcg ctattacgcc 5640
 agctggatct tcgagcgtcc caaaaccttc tcaagcaagg ttttcagtat aatgttacat 5700
 30 gcgtacacgc gtctgtacag aaaaaaaga aaaatttgaa atataaataa cgttcttaat 5760
 actaacataa ctataaaaaa ataaataggg acctagactt caggttgtct aactccttcc 5820
 35 ttttcgggta gagcggatct tagctagccg cggtaccaag cttaggcgag agtcagctgc 5880
 cttatgcggc ctgaggcagc tottgctttt cctgacgcgg ctcgagcagt tcctgaagcg 5940
 gcctgggcct catcgccag caggtagtct acaccttccc caattgcatg ggctagggga 6000
 40 gcggcaggtg ggaacaatgt ggagaccacc ggcacagcta tcctccttat ggcccgatt 6060
 atgtctttga agccgaatgc tcctgcaatc ttcaggggag agttgaggtc ggccacctcc 6120
 45 atgaagtatt cacgaaagtc agtgactcc cttgttggcc agacggtctt gatgccaaga 6180
 cggtcctct cactcagtat caattttgtg tagttcatgg ctctgggtc aaatcggccg 6240
 tattctgtaa ccaggttctt tgctagttca ggatttgga tcagctcgaa gttgctcacc 6300
 50 ccagcgaccg taacgacgga tcctgttgcc actctttcgt aggccactag cgtgacggga 6360
 cggagggccc ctggatagtt gccaccatgg atcgtcactg ctaggctccc tcttgccgac 6420
 55 catgacatct gatccctgc ctgaccacca cttttggagg tcactatctc cagtttgatg 6480
 gatgtgattg gctgggttat ctggtttgtt ggaatcacia gattgaatgg cataagggtt 6540
 tcggtgccgg tcgtcagccc attgtttgcg gccacagccc tgggtgattac cgttgtccca 6600
 60 tcaaagccta tgaggtagat ggtggcgccc agtacaaggc cgtggacgct tgttcgaaac 6660

acgagctctc ccccaacgct gaggcttgtg atggcatcaa tgttggctga gaacagtgtg 6720
 5 attgttacct cactgggtg gtactgtgat gagaattggg aatcatcggc tgcagttatg 6780
 gtgtagactc tgggcctgtc actgctgtca catgtggcta ccatttttgg gtcaagccct 6840
 attgcgggaa tggggtcacc aagcctcaca tacccaagat catatgatgt gggtaagctg 6900
 10 aggacggtga ccccttcccc tactaggacg ttcccaattt tgcgttgat gttggctgtt 6960
 gcagacatca acccattgta gctaacatct gtcagttcac tcaggcttcc ttggaagggtc 7020
 acggcggttta tgggtgccgtt tagtgcataa acgccaccag gaagtgtgct tgacctcact 7080
 15 gtgagactcc gactcactag cctgcagtag ttgtaactgg ccggtaggtt ctgggcagtc 7140
 aggagcatct gatcgaactt gtagttccca ttgcctgca gtgtgtagtg agcaccacaca 7200
 20 attgagccag ggaatccagg gaaaaagaca attagccctg accctgtgtc cccacagtc 7260
 aaattgtagg tcgaggtctc tgacctgaga gtgtgcttct ccagggtgtc gtcoggaatg 7320
 gacgccgggtc cggttgttgg catcagaagg ctccgtatga acggaacaat ctgctgggtt 7380
 25 tgatctgaca ggtttgtcat agatccgggg ttttttctcc ttgacgttaa agtatagagg 7440
 tatattaaca attttttgtt gatactttta ttacatttga ataagaagta atacaaaccg 7500
 30 aaaatgttga aagtattagt taaagtgggt atgcagtttt tgcatttata tatctgttaa 7560
 tagatcaaaa atcatcgctt cgctgattaa ttaccccaga aataaggcta aaaaactaat 7620
 cgcattatca tcctatgggt gttaatttga ttcgttcatt tgaaggtttg tggggccagg 7680
 35 ttactgccaa tttttcctct tcataaccat aaaagctagt attgtagaat ctttattgtt 7740
 cggagcagtg cggcgcgagg cacatctgcg ttccaggaac gcgaccggtg aagacgagga 7800
 40 cgcacggagg agagtcttcc ttccggagggc tgtcaccgc tcggcggtt ctaatccgta 7860
 cttcaatata gcaatgagca gttaagcgta ttactgaaag ttccaaagag aagggttttt 7920
 taggctaaga taatggggct ctttacattt ccacaacata taagtaagat tagatatgga 7980
 45 tatgtatatg gatatgtata tgggtgtaat gccatgtaat atgattatta aacttctttg 8040
 cgtccatcca aaaaaaagt aagaattttt gaaaattcga attcg atg gct gca tca 8097
 Met Ala Ala Ser
 50 1
 gag ttc aaa gag acc ccc gaa ctc gag agt gcc gtc aga gca atg gaa 8145
 Glu Phe Lys Glu Thr Pro Glu Leu Glu Ser Ala Val Arg Ala Met Glu
 5 10 15 20
 55 gca gca gcc aac gtg gac cca cta ttc caa tct gca ctc agt gtg ttc 8193
 Ala Ala Ala Asn Val Asp Pro Leu Phe Gln Ser Ala Leu Ser Val Phe
 25 30 35
 60 atg tgg ctg gaa gag aat ggg att gtg act gac atg gcc aac ttc gca 8241

	Met	Trp	Leu	Glu	Glu	Asn	Gly	Ile	Val	Thr	Asp	Met	Ala	Asn	Phe	Ala	
				40					45					50			
5	ctc	agc	gac	ccg	aac	gcc	cat	cgg	atg	cga	aat	ttt	ctt	gca	aac	gca	8289
	Leu	Ser	Asp	Pro	Asn	Ala	His	Arg	Met	Arg	Asn	Phe	Leu	Ala	Asn	Ala	
			55				60					65					
10	cca	caa	gca	ggc	agc	aag	tcg	caa	agg	gcc	aag	tac	ggg	aca	gca	ggc	8337
	Pro	Gln	Ala	Gly	Ser	Lys	Ser	Gln	Arg	Ala	Lys	Tyr	Gly	Thr	Ala	Gly	
		70					75					80					
15	tac	gga	gtg	gag	gct	cgg	ggc	ccc	aca	cca	gag	gaa	gca	cag	agg	gaa	8385
	Tyr	Gly	Val	Glu	Ala	Arg	Gly	Pro	Thr	Pro	Glu	Glu	Ala	Gln	Arg	Glu	
	85					90					95					100	
	aaa	gac	aca	cgg	atc	tca	aag	aag	atg	gag	acc	atg	ggc	atc	tac	ttt	8433
	Lys	Asp	Thr	Arg	Ile	Ser	Lys	Lys	Met	Glu	Thr	Met	Gly	Ile	Tyr	Phe	
					105					110					115		
20	gca	aca	cca	gaa	tgg	gta	gca	ctc	aat	ggg	cac	cga	ggg	cca	agc	cca	8481
	Ala	Thr	Pro	Glu	Trp	Val	Ala	Leu	Asn	Gly	His	Arg	Gly	Pro	Ser	Pro	
				120					125					130			
25	ggc	cag	gta	aag	tac	tgg	cag	aac	aaa	cga	gaa	ata	ccg	gac	cca	aac	8529
	Gly	Gln	Val	Lys	Tyr	Trp	Gln	Asn	Lys	Arg	Glu	Ile	Pro	Asp	Pro	Asn	
			135					140					145				
30	gag	gac	tat	cta	gac	tac	gtg	cat	gca	gag	aag	agc	cgg	ttg	gca	tca	8577
	Glu	Asp	Tyr	Leu	Asp	Tyr	Val	His	Ala	Glu	Lys	Ser	Arg	Leu	Ala	Ser	
		150					155					160					
35	gaa	gaa	caa	atc	cta	agg	gca	gct	acg	tcg	atc	tac	ggg	gct	cca	gga	8625
	Glu	Glu	Gln	Ile	Leu	Arg	Ala	Ala	Thr	Ser	Ile	Tyr	Gly	Ala	Pro	Gly	
	165					170					175					180	
	cag	gca	gag	cca	ccc	caa	gct	ttc	ata	gac	gaa	gtt	gcc	aaa	gtc	tat	8673
	Gln	Ala	Glu	Pro	Pro	Gln	Ala	Phe	Ile	Asp	Glu	Val	Ala	Lys	Val	Tyr	
					185					190					195		
40	gaa	atc	aac	cat	gga	cgt	ggc	cca	aac	caa	gaa	cag	atg	aaa	gat	ctg	8721
	Glu	Ile	Asn	His	Gly	Arg	Gly	Pro	Asn	Gln	Glu	Gln	Met	Lys	Asp	Leu	
				200					205					210			
45	ctc	ttg	act	gcg	atg	gag	atg	aag	cat	cgc	aat	ccc	agg	cgg	gct	cta	8769
	Leu	Leu	Thr	Ala	Met	Glu	Met	Lys	His	Arg	Asn	Pro	Arg	Arg	Ala	Leu	
			215					220				225					
50	cca	aag	ccc	aag	cca	aaa	ccc	aat	gct	cca	aca	cag	aga	ccc	cct	ggt	8817
	Pro	Lys	Pro	Lys	Pro	Lys	Pro	Asn	Ala	Pro	Thr	Gln	Arg	Pro	Pro	Gly	
		230					235					240					
55	cgg	ctg	ggc	cgc	tgg	atc	agg	acc	gtc	tct	gat	gag	gac	ctt	gag	gga	8865
	Arg	Leu	Gly	Arg	Trp	Ile	Arg	Thr	Val	Ser	Asp	Glu	Asp	Leu	Glu	Gly	
	245					250					255					260	
	tcc	atc	gcc	acc	atg	gtg	agc	aag	ggc	gag	gag	ctg	ttc	acc	ggg	gtg	8913
	Ser	Ile	Ala	Thr	Met	Val	Ser	Lys	Gly	Glu	Glu	Leu	Phe	Thr	Gly	Val	
					265					270					275		
60	gtg	ccc	atc	ctg	gtc	gag	ctg	gac	ggc	gac	gta	aac	ggc	cac	aag	ttc	8961

	Val	Pro	Ile	Leu	Val	Glu	Leu	Asp	Gly	Asp	Val	Asn	Gly	His	Lys	Phe	
				280					285					290			
5	agc	gtg	tcc	ggc	gag	ggc	gag	ggc	gat	gcc	acc	tac	ggc	aag	ctg	acc	9009
	Ser	Val	Ser	Gly	Glu	Gly	Glu	Gly	Asp	Ala	Thr	Tyr	Gly	Lys	Leu	Thr	
			295					300					305				
10	ctg	aag	ttc	atc	tgc	acc	acc	ggc	aag	ctg	ccc	gtg	ccc	tgg	ccc	acc	9057
	Leu	Lys	Phe	Ile	Cys	Thr	Thr	Gly	Lys	Leu	Pro	Val	Pro	Trp	Pro	Thr	
		310					315					320					
15	ctc	gtg	acc	acc	ctg	acc	tac	ggc	gtg	cag	tgc	ttc	agc	cgc	tac	ccc	9105
	Leu	Val	Thr	Thr	Leu	Thr	Tyr	Gly	Val	Gln	Cys	Phe	Ser	Arg	Tyr	Pro	
	325					330				335						340	
20	gac	cac	atg	aag	cag	cac	gac	ttc	ttc	aag	tcc	gcc	atg	ccc	gaa	ggc	9153
	Asp	His	Met	Lys	Gln	His	Asp	Phe	Phe	Lys	Ser	Ala	Met	Pro	Glu	Gly	
					345					350					355		
25	tac	gtc	cag	gag	cgc	acc	atc	ttc	ttc	aag	gac	gac	ggc	aac	tac	aag	9201
	Tyr	Val	Gln	Glu	Arg	Thr	Ile	Phe	Phe	Lys	Asp	Asp	Gly	Asn	Tyr	Lys	
				360					365						370		
30	acc	cgc	gcc	gag	gtg	aag	ttc	gag	ggc	gac	acc	ctg	gtg	aac	cgc	atc	9249
	Thr	Arg	Ala	Glu	Val	Lys	Phe	Glu	Gly	Asp	Thr	Leu	Val	Asn	Arg	Ile	
			375					380					385				
35	gag	ctg	aag	ggc	atc	gac	ttc	aag	gag	gac	ggc	aac	atc	ctg	ggg	cac	9297
	Glu	Leu	Lys	Gly	Ile	Asp	Phe	Lys	Glu	Asp	Gly	Asn	Ile	Leu	Gly	His	
		390				395						400					
40	aag	ctg	gag	tac	aac	tac	aac	agc	cac	aac	gtc	tat	atc	atg	gcc	gac	9345
	Lys	Leu	Glu	Tyr	Asn	Tyr	Asn	Ser	His	Asn	Val	Tyr	Ile	Met	Ala	Asp	
	405					410					415					420	
45	aag	cag	aag	aac	ggc	atc	aag	gtg	aac	ttc	aag	atc	cgc	cac	aac	atc	9393
	Lys	Gln	Lys	Asn	Gly	Ile	Lys	Val	Asn	Phe	Lys	Ile	Arg	His	Asn	Ile	
				425						430					435		
50	gag	gac	ggc	agc	gtg	cag	ctc	gcc	gac	cac	tac	cag	cag	aac	acc	ccc	9441
	Glu	Asp	Gly	Ser	Val	Gln	Leu	Ala	Asp	His	Tyr	Gln	Gln	Asn	Thr	Pro	
				440				445						450			
55	atc	ggc	gac	ggc	ccc	gtg	ctg	ctg	ccc	gac	aac	cac	tac	ctg	agc	acc	9489
	Ile	Gly	Asp	Gly	Pro	Val	Leu	Leu	Pro	Asp	Asn	His	Tyr	Leu	Ser	Thr	
			455					460					465				
60	cag	tcc	gcc	ctg	agc	aaa	gac	ccc	aac	gag	aag	cgc	gat	cac	atg	gtc	9537
	Gln	Ser	Ala	Leu	Ser	Lys	Asp	Pro	Asn	Glu	Lys	Arg	Asp	His	Met	Val	
		470					475					480					
65	ctg	ctg	gag	ttc	gtg	acc	gcc	gcc	ggg	atc	act	ctc	ggc	atg	gac	gag	9585
	Leu	Leu	Glu	Phe	Val	Thr	Ala	Ala	Gly	Ile	Thr	Leu	Gly	Met	Asp	Glu	
	485					490					495					500	
70	ctg	tac	aag	taa	agc												9600
	Leu	Tyr	Lys														

⋮
⋮

⋮
⋮

⋮
⋮
⋮
⋮
⋮

⋮
⋮
⋮
⋮
⋮
⋮

<210> 8
 <211> 503
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> Plásmido pESCURA/pVP2-VP3-GFP
 <400> 8
 10 Met Ala Ala Ser Glu Phe Lys Glu Thr Pro Glu Leu Glu Ser Ala Val
 1 5 10 15
 Arg Ala Met Glu Ala Ala Ala Asn Val Asp Pro Leu Phe Gln Ser Ala
 20 20 25 30
 15 Leu Ser Val Phe Met Trp Leu Glu Glu Asn Gly Ile Val Thr Asp Met
 35 40 45
 Ala Asn Phe Ala Leu Ser Asp Pro Asn Ala His Arg Met Arg Asn Phe
 20 50 55 60
 Leu Ala Asn Ala Pro Gln Ala Gly Ser Lys Ser Gln Arg Ala Lys Tyr
 65 70 75 80
 25 Gly Thr Ala Gly Tyr Gly Val Glu Ala Arg Gly Pro Thr Pro Glu Glu
 85 90 95
 Ala Gln Arg Glu Lys Asp Thr Arg Ile Ser Lys Lys Met Glu Thr Met
 100 105 110
 30 Gly Ile Tyr Phe Ala Thr Pro Glu Trp Val Ala Leu Asn Gly His Arg
 115 120 125
 Gly Pro Ser Pro Gly Gln Val Lys Tyr Trp Gln Asn Lys Arg Glu Ile
 130 135 140
 35 Pro Asp Pro Asn Glu Asp Tyr Leu Asp Tyr Val His Ala Glu Lys Ser
 145 150 155 160
 40 Arg Leu Ala Ser Glu Glu Gln Ile Leu Arg Ala Ala Thr Ser Ile Tyr
 165 170 175
 Gly Ala Pro Gly Gln Ala Glu Pro Pro Gln Ala Phe Ile Asp Glu Val
 180 185 190
 45 Ala Lys Val Tyr Glu Ile Asn His Gly Arg Gly Pro Asn Gln Glu Gln
 195 200 205
 Met Lys Asp Leu Leu Leu Thr Ala Met Glu Met Lys His Arg Asn Pro
 210 215 220
 50 Arg Arg Ala Leu Pro Lys Pro Lys Pro Lys Pro Asn Ala Pro Thr Gln
 225 230 235 240
 55 Arg Pro Pro Gly Arg Leu Gly Arg Trp Ile Arg Thr Val Ser Asp Glu
 245 250 255
 Asp Leu Glu Gly Ser Ile Ala Thr Met Val Ser Lys Gly Glu Glu Leu
 260 265 270
 60

Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu Val Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn
 275 280 285

5 Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly Glu Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr
 290 295 300

Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile Cys Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val
 305 310 315 320

10 Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr Leu Thr Tyr Gly Val Gln Cys Phe
 325 330 335

Ser Arg Tyr Pro Asp His Met Lys Gln His Asp Phe Phe Lys Ser Ala
 340 345 350

15 Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu Arg Thr Ile Phe Phe Lys Asp Asp
 355 360 365

20 Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu Val Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu
 370 375 380

Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly Ile Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn
 385 390 395 400

25 Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr Asn Tyr Asn Ser His Asn Val Tyr
 405 410 415

Ile Met Ala Asp Lys Gln Lys Asn Gly Ile Lys Val Asn Phe Lys Ile
 420 425 430

30 Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Ser Val Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln
 435 440 445

Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn His
 450 455 460

35 Tyr Leu Ser Thr Gln Ser Ala Leu Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg
 465 470 475 480

40 Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe Val Thr Ala Ala Gly Ile Thr Leu
 485 490 495

Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys
 500

45

<210> 9
 <211> 33
 <212> DNA
 50 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Oligo V...

55 <400> 9
 gcgcgaattc gatggcatca gagttcaaag aga

60 <210> 10
 <211> 32

<212> DNA
 <213> Secuencia artificial

 5 <220>
 <223> Oligo VI

 <400> 10
 cgcggtatccc tcaaggctct catcagagac gg 32

 10 <210> 11
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

 15 <220>
 <223> Oligo CD8 A

 20 <400> 11
 aacgaggaca gttatgtccc aagcgcagaa caaata 36

 <210> 12
 <211> 36
 25 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 30 <223> Oligo CD8 B

 <400> 12
 tatttgttct gcgcttgga cataactgtc ctcggt 36

 35 <210> 13
 <211> 5676
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

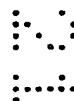
 40 <220>
 <223> Plásmido pFB/his-CD8-VP3

 <220>
 45 <221> promotor
 <222> (1)..(129)
 <223> Promotor de poliedrina

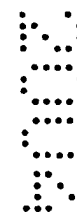
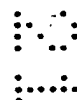
 <220>
 50 <221> CDS
 <222> (147)..(1043)
 <223> His-CD8-VP3 ORF

 <220>
 55 <221> CDS
 <222> (222)..(257)
 <223> His-CD8 ORF

 <400> 13
 60 atcatggaga taattaaaat gataaccatc tcgcaaataa ataagtattt tactgttttc 60



	gtaacagttt tgtaataaaa aaacctataa atattccgga ttattcatatcggtcccaccca	120
	tcgggagcgagg atctcggtcc gaaacc atg tcg tac tac cat cac cat cac cat	173
5	Met Ser Tyr Tyr His His His His His	
	1 5	
	cac gat tac gat atc cca acg acc gaa aac ctg tat ttt cag ggc gcg	221
	His Asp Tyr Asp Ile Pro Thr Thr Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Gly Ala	
	10 15 20 25	
10	aac gag gac agt tat gtc cca agc gca gaa caa ata gcc gcc atg gct	269
	Asn Glu Asp Ser Tyr Val Pro Ser Ala Glu Gln Ile Ala Ala Met Ala	
	30 35 40	
15	gca tca gag ttc aaa gag acc ccc gaa ctc gag agt gcc gtc aga gca	317
	Ala Ser Glu Phe Lys Glu Thr Pro Glu Leu Glu Ser Ala Val Arg Ala	
	45 50 55	
20	atg gaa gca gca gcc aac gtg gac cca cta ttc caa tct gca ctc agt	365
	Met Glu Ala Ala Ala Asn Val Asp Pro Leu Phe Gln Ser Ala Leu Ser	
	60 65 70	
	gtg ttc atg tgg ctg gaa gag aat ggg att gtg act gac atg gcc aac	413
	Val Phe Met Trp Leu Glu Glu Asn Gly Ile Val Thr Asp Met Ala Asn	
25	75 80 85	
	ttc gca ctc agc gac ccg aac gcc cat cgg atg cga aat ttt ctt gca	461
	Phe Ala Leu Ser Asp Pro Asn Ala His Arg Met Arg Asn Phe Leu Ala	
	90 95 100 105	
30	aac gca cca caa gca ggc agc aag tcg caa agg gcc aag tac ggg aca	509
	Asn Ala Pro Gln Ala Gly Ser Lys Ser Gln Arg Ala Lys Tyr Gly Thr	
	110 115 120	
35	gca ggc tac gga gtg gag gct cgg ggc ccc aca cca gag gaa gca cag	557
	Ala Gly Tyr Gly Val Glu Ala Arg Gly Pro Thr Pro Glu Glu Ala Gln	
	125 130 135	
	agg gaa aaa gac aca cgg atc tca aag aag atg gag acc atg ggc atc	605
40	Arg Glu Lys Asp Thr Arg Ile Ser Lys Lys Met Glu Thr Met Gly Ile	
	140 145 150	
	tac ttt gca aca cca gaa tgg gta gca ctc aat ggg cac cga ggg cca	653
45	Tyr Phe Ala Thr Pro Glu Trp Val Ala Leu Asn Gly His Arg Gly Pro	
	155 160 165	
	agc cca ggc cag gta aag tac tgg cag aac aaa cga gaa ata ccg gac	701
	Ser Pro Gly Gln Val Lys Tyr Trp Gln Asn Lys Arg Glu Ile Pro Asp	
	170 175 180 185	
50	cca aac gag gac tat cta gac tac gtg cat gca gag aag agc cgg ttg	749
	Pro Asn Glu Asp Tyr Leu Asp Tyr Val His Ala Glu Lys Ser Arg Leu	
	190 195 200	
55	gca tca gaa gaa caa atc cta agg gca gct acg tcg atc tac ggg gct	797
	Ala Ser Glu Glu Gln Ile Leu Arg Ala Ala Thr Ser Ile Tyr Gly Ala	
	205 210 215	



	cca gga cag gca gag cca ccc caa gct ttc ata gac gaa gtt gcc aaa	845
	Pro Gly Gln Ala Glu Pro Pro Gln Ala Phe Ile Asp Glu Val Ala Lys	
	220 225 230	
5	gtc tat gaa atc aac cat gga cgt ggc cca aac caa gaa cag atg aaa	893
	Val Tyr Glu Ile Asn His Gly Arg Gly Pro Asn Gln Glu Gln Met Lys	
	235 240 245	
10	gat ctg ctc ttg act gcg atg gag atg aag cat cgc aat ccc agg cgg	941
	Asp Leu Leu Leu Thr Ala Met Glu Met Lys His Arg Asn Pro Arg Arg	
	250 255 260 265	
15	gct cta cca aag ccc aag cca aaa ccc aat gct cca aca cag aga ccc	989
	Ala Leu Pro Lys Pro Lys Pro Lys Pro Asn Ala Pro Thr Gln Arg Pro	
	270 275 280	
20	cct ggt cgg ctg ggc cgc tgg atc agg acc gtc tct gat gag gac ctt	1037
	Pro Gly Arg Leu Gly Arg Trp Ile Arg Thr Val Ser Asp Glu Asp Leu	
	285 290 295	
	gag tga ggatccggaa ttcaaaggcc tacgtcgacg agctcactag tcgcgggccgc	1093
	Glu	
25	tttcgaatct agagcctgca gtctcgaggc atgcggtacc aagcttgctg agaagtacta	1153
	gaggatcata atcagccata ccacatttgt agagggttta cttgctttaa aaaacctccc	1213
30	acacctcccc ctgaacctga aacataaaat gaatgcaatt gttgttggtta acttgtttat	1273
	tgcagcttat aatgggttaca aataaagcaa tagcatcaca aatttcacaa ataaagcatt	1333
	tttttactg cattctagtt gtggtttgtc caaactcatc aatgtatctt atcatgtctg	1393
35	gatctgatca ctagatctgc ctaggagatc cgaaccagat aagtgaatc tagttccaaa	1453
	ctattttgtc atttttaatt ttcgtattag cttacgacgc tacaccagcag tcccatctat	1513
40	tttgtcactc ttccctaaat aatccttaaa aactccattt ccacctctcc cagttcccaa	1573
	ctattttgtc cgccacagc ggggcatttt tcttctgtgt atgtttttta tcaaaccatcc	1633
	tgccaactcc atgtgacaaa ccgtcatctt cggtacttt ttctctgtca cagaatgaaa	1693
45	atttttctgt catctcttcg ttattaatgt ttgtaattga ctgaatatca acgcttattt	1753
	gcagcctgaa tggcgaatgg gacgcgccct gtagcggcgc attaagcgcg gcgggtgtgg	1813
50	tggttacgcg cagcgtgacc gctacacttg ccagcgccct agcgcgccgt cctttcgctt	1873
	tcttcccttc ctttctcgcc acgttcgccc gctttccccg tcaagctcta aatcgggggc	1933
	tccctttagg gttccgattt agtgctttac ggcacctga ccccaaaaaa cttgattagg	1993
55	gtgatgggtc acgtagtggg ccacgcgccct gatagacggt ttttcgccct ttgacgttgg	2053
	agtccacggt ctttaaatagt ggactcttgt tccaaactgg aacaacactc aaccctatct	2113
60	cggcttattc ttttgattta taagggattt tgccgatttc ggcctattgg ttaaaaaatg	2173

agctgattta acaaaaattht aacgcgaatt ttaacaaaat attaacgttht acaatthtcag 2233
 gtggcacttht tcggggaaat gtgcgcggaa cccctatttg tttattthtc taaatacatt 2293
 5 caaatatgta tccgctcatg agacaataac cctgataaat gcttcaataa tattgaaaaa 2353
 ggaagagtat gagtattcaa catttcctgt tcgcccttat tccctthttt gcggcatttht 2413
 gccttcctgt ttttgctcac ccagaaacgc tggtgaaagt aaaagatgct gaagatcagt 2473
 10 tgggtgcacg agtgggttac atcgaactgg atctcaacag cggtaaagatc cttgagagtt 2533
 ttcgccccga agaacgttht ccaatgatga gcactthtaa agttctgcta tgtggcgcg 2593
 15 tattatcccg tattgacgcc gggcaagagc aactcggtcg ccgcatacac tattctcaga 2653
 atgacttggt tgagtactca ccagtcacag aaaagcatct tacggatggc atgacagtaa 2713
 gagaattatg cagtgtgcc ataaccatga gtgataacac tgcggccaac ttacttctga 2773
 20 caacgatcgg aggaccgaag gagctaaccg cthttthtgca caacatgggg gatcatgtaa 2833
 ctgccttgta tcgttgggaa ccggagctga atgaagccat accaaacgac gagcgtgaca 2893
 25 ccacgatgcc tgtagcaatg gcaacaacgt tgcgcaaact attactggc gaactactta 2953
 ctctagcttc ccggcaacaa ttaatagact ggatggaggc ggataaagtt gcaggaccac 3013
 ttctgcgctc ggcccttcg gctggctggt ttattgctga taaatctgga gccggtgagc 3073
 30 gtgggtctcg cggtatcatt gcagcactgg ggccagatgg taagccctcc cgtatcgtag 3133
 ttatctacac gacggggagt caggcaacta tggatgaacg aaatagacag atcgttgaga 3193
 35 taggtgcctc actgattaag cattggtaac tgtcagacca agthttactca tatatacttht 3253
 agattgattt aaaacttcat tthtaattta aaaggatcta ggtgaagatc cthtttgata 3313
 atctcatgac caaaatccct taacgtgagt thtcgttcca ctgagcgtca gaccccgtag 3373
 40 aaaagatcaa aggatcttct tgagatcctt tthttctgcg cgtaatctgc tgcttgcaaa 3433
 caaaaaaacc accgctacca gcgggtggtt gtttgccgga tcaagagcta ccaactcttht 3493
 45 ttccgaaggt aactggcttc agcagagcgc agataccaaa tactgtcctt ctagtgtagc 3553
 cgtagttagg ccaccacttc aagaactctg tagcaccgcc tacatactc gctctgctaa 3613
 tcctgttacc agtggctgct gccagtggcg ataagtcgtg tcttaccggg ttggactcaa 3673
 50 gacgatagtt accggataag gcgcagcggc cgggctgaac ggggggttcg tgcacacagc 3733
 ccagcttgga gcgaacgacc tacaccgaac tgagatacct acagcgtgag cattgagaaa 3793
 55 gcgccacgct tccgaaggg agaaaggcgg acaggtatcc ggtaagcggc agggtcggaa 3853
 caggagagcg cacgagggag cttccagggg gaaacgcctg gtatcttht agtcctgtcg 3913
 ggthtcgcca cctctgactt gagcgtcgat tthtgatg ctgctcaggg gggcgagacc 3973
 60

tatggaaaaa cgccagcaac ggggcctttt tacggttcct ggccttttgc tggccttttg 4033
 ctcacatgtt ctttcctgcg ttatcccttg attctgtgga taaccgtatt accgcctttg 4093
 5 agtgagctga taccgctcgc cgcagccgaa cgaccgagcg cagcgagtca gtgagcgagg 4153
 aagcggaaga ggcctgatg cggatatttc tccttacgca tctgtgcggt atttcacacc 4213
 gcagaccagc cgcgtaacct ggcaaaatcg gttacggttg agtaataaat ggatgccctg 4273
 10 cgtaagcggg tgtgggcgga caataaagtc ttaaactgaa caaaatagat cttaaactatg 4333
 acaataaagt cttaaactag acagaatagt tgtaaactga aatcagtcca gttatgctgt 4393
 15 gaaaaagcat actggacttt tgttatggct aaagcaaact cttcattttc tgaagtgcaa 4453
 attgcccgtc gtattaaaga ggggcgtggc caagggcatg gtaaagacta tattcgcggc 4513
 gttgtgacaa tttaccgaac aactccgcgg ccgggaagcc gatctcggct tgaacgaatt 4573
 20 gttaggtggc ggtacttggg tcgatatcaa agtgcacac ttcttcccgt atgcccact 4633
 ttgtatagag agccactgcg ggatcgtcac cgtaatctgc ttgcacgtag atcacataag 4693
 25 caccaagcgc gttggcctca tgcttgagga gattgatgag cgcggtggca atgccctgcc 4753
 tccggtgctc gccggagact gcgagatcat agatatagat ctactacgc ggctgctcaa 4813
 acctgggcag aacgtaagcc gcgagagcgc caacaaccgc ttcttggtcg aaggcagcaa 4873
 30 gcgcgatgaa tgtcttacta cggagcaagt tcccgaggta atcggagtcc ggctgatgtt 4933
 gggagtaggt ggctacgtct ccgaactcac gaccgaaaag atcaagagca gcccgcattg 4993
 35 atttgacttg gtcagggcgc agcctacatg tgccaatgat gcccatactt gagccacct 5053
 actttgtttt agggcgactg ccctgctgcg taacatcggt gctgctgctg aacatcggtt 5113
 ctgctccata acatcaaaca tcgaccacg gcgtaacgcg cttgctgctt ggatgcccg 5173
 40 ggcatagact gtacaaaaaa acagtcataa caagccatga aaaccgccac tgcgcggtta 5233
 ccaccgctgc gttcgggtcaa ggttctggac cagttgcgtg agcgcatagc ctacttgcac 5293
 45 tacagtttac gaaccgaaca ggcttatgtc aactgggttc gtgccttcac ccgtttccac 5353
 ggtgtgcgtc acccggaac cttgggcagc agcgaagtcg aggcatttct gtccctggctg 5413
 gcgaacgagc gcaaggtttc ggtctccacg catcgtcagg cattggcggc cttgctgttc 5473
 50 ttctacggca aggtgctgtg cacggatctg ccctggcttc aggagatcgg aagacctcg 5533
 ccgtcgcggc gcttgccggt ggtgctgacc ccggatgaag tggttcgcat cctcggtttt 5593
 55 ctggaaggcg agcatcgttt gttcgcccag gactctagct atagtcttag tggttggcta 5653
 cgtatactcc ggaatattaa tag 5676

<210> 14
 <211> 298
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>

<223> Plásmido pFB/his-CD8-VP3

10 <400> 14

Met Ser Tyr Tyr His His His His His His Asp Tyr Asp Ile Pro Thr
 1 5 10 15

15 Thr Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Gly Ala Asn Glu Asp Ser Tyr Val Pro
 20 25 30

Ser Ala Glu Gln Ile Ala Ala Met Ala Ala Ser Glu Phe Lys Glu Thr
 35 40 45

20 Pro Glu Leu Glu Ser Ala Val Arg Ala Met Glu Ala Ala Ala Asn Val
 50 55 60

25 Asp Pro Leu Phe Gln Ser Ala Leu Ser Val Phe Met Trp Leu Glu Glu
 65 70 75 80

Asn Gly Ile Val Thr Asp Met Ala Asn Phe Ala Leu Ser Asp Pro Asn
 85 90 95

30 Ala His Arg Met Arg Asn Phe Leu Ala Asn Ala Pro Gln Ala Gly Ser
 100 105 110

Lys Ser Gln Arg Ala Lys Tyr Gly Thr Ala Gly Tyr Gly Val Glu Ala
 115 120 125

35 Arg Gly Pro Thr Pro Glu Glu Ala Gln Arg Glu Lys Asp Thr Arg Ile
 130 135 140

40 Ser Lys Lys Met Glu Thr Met Gly Ile Tyr Phe Ala Thr Pro Glu Trp
 145 150 155 160

Val Ala Leu Asn Gly His Arg Gly Pro Ser Pro Gly Gln Val Lys Tyr
 165 170 175

45 Trp Gln Asn Lys Arg Glu Ile Pro Asp Pro Asn Glu Asp Tyr Leu Asp
 180 185 190

Tyr Val His Ala Glu Lys Ser Arg Leu Ala Ser Glu Glu Gln Ile Leu
 195 200 205

50 Arg Ala Ala Thr Ser Ile Tyr Gly Ala Pro Gly Gln Ala Glu Pro Pro
 210 215 220

55 Gln Ala Phe Ile Asp Glu Val Ala Lys Val Tyr Glu Ile Asn His Gly
 225 230 235 240

Arg Gly Pro Asn Gln Glu Gln Met Lys Asp Leu Leu Leu Thr Ala Met
 245 250 255

60

Glu Met Lys His Arg Asn Pro Arg Arg Ala Leu Pro Lys Pro Lys Pro
260 265 270

5 Lys Pro Asn Ala Pro Thr Gln Arg Pro Pro Gly Arg Leu Gly Arg Trp
275 280 285

Ile Arg Thr Val Ser Asp Glu Asp Leu Glu
290 295

